

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3/19/1 DIALOG(R)File 351:Derwent WPI (c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

011624997

WPI Acc No: 1998-042125/199804

XRAM Acc No: C98-014110

XRPX Acc No: N98-033706

**Material having immobilised bioactive species on polymeric substrates - comprises a support, polymeric surfactant attached to support and cross-linked in situ in first layer and hydrophilic polymer in the second layer, use for cells, enzymes, proteins, etc.**

Patent Assignee: GORE ENTERPRISE HOLDINGS INC (GORE ); GORE HYBRID TECHNOLOGIES INC (GORE )

Inventor: DRUMHELLER P D

Number of Countries: 068 Number of Patents: 009

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9746590	A1	19971211	WO 97US9634	A	19970602	199804 B
AU 9732297	A	19980105	AU 9732297	A	19970602	199821
US 5874165	A	19990223	US 96660698	A	19960603	199915
			US 97863263	A	19970527	
EP 910584	A1	19990428	EP 97927968	A	19970602	199921
			WO 97US9634	A	19970602	
US 5897955	A	19990427	US 96660698	A	19960603	199924
			US 98138197	A	19980821	
US 5914182	A	19990622	US 96660698	A	19960603	199931
EP 910584	B1	20010725	EP 97927968	A	19970602	200143
			WO 97US9634	A	19970602	
DE 69705841	E	20010830	DE 605841	A	19970602	200158
			EP 97927968	A	19970602	
			WO 97US9634	A	19970602	
CA 2256766	C	20021126	CA 2256766	A	19970602	200305
			WO 97US9634	A	19970602	

Priority Applications (No Type Date): US 97863263 A 19970527; US 96660698 A 19960603; US 98138197 A 19980821

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 9746590 A1 E 65 C07K-017/08

Designated States (National): AL AM AT AU AZ BB BG BR BY CA CH CN CZ DE

DK EE ES FI GB GE HU IL IS JP KE KG KP KR KZ LK LR LS LT LU LV MD MG MK

MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK TJ TM TR TT UA UG UZ VN

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC

NL PT SE

AU 9732297 A C07K-017/08 Based on patent WO 9746590

US 5874165 A B32B-005/14 CIP of application US 96660698

EP 910584 A1 E C07K-017/08 Based on patent WO 9746590

Designated States (Regional): DE FR GB IT SE

US 5897955 A B32B-027/00 Cont of application US 96660698

US 5914182 A B32B-005/14

EP 910584 B1 E C07K-017/08 Based on patent WO 9746590

Designated States (Regional): DE FR GB IT SE

DE 69705841 E C07K-017/08 Based on patent EP 910584

Based on patent WO 9746590

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



CA 2256766 C E C07K-017/08 Based on patent WO 9746590  
Abstract (Basic): WO 9746590 A

A material having immobilised bioactive species comprises: (a) a support member; (b) a first layer comprised of at least 1 species of a polymeric surfactant attached to (a) and cross-linked together in situ; (c) a second layer comprised of at least 1 species of a hydrophilic polymer attached to (b), and (d) at least 1 type of bioactive species attached to (c).

The support member is elected from silk, wool and leather or it is a polymer material. Polymer support members are selected from porous and non-porous polytetrafluoroethylene (PTFE), polyethylene, polypropylene, polyethylene terephthalate, polyurethane, polystyrene, etc. The surfactant is polyvinyl alcohol (PVA), polyethylene or polypropylene glycol (PEG or PPG), dextran, alginate, polyacrylamide, polyglycidol, polyacrylic acid, polylysine, polyethylene-imine, etc. The hydrophilic polymer is PVA, polylysine, polyacrylic acid, poly-(acrylonitrile/acrylic acid/acrylamidine), poly(hydroxyethyl methacrylate), PVP, PEG, alginate, sepharose, agarose, polyethylene-imine, polyallylamine, etc. Spacer molecules comprise succinic acid, diaminoethane, glyoxylic acid, short chain PEG, and glycine.

USE -The bioactive species include enzymes or other organic catalysts, ribozymes, organometallics, proteins and glycoproteins, peptides, poly(amino acids), antibodies, nucleic acids, steroids, antibiotics, antimycotics, cytokines, carbohydrates, oleophobics, lipids, or pharmaceuticals or therapeutics. Larger entities are cells, i.e. plant, animal or microbial cells, optionally genetically engineered, mitochondria, protists, viruses, virions, and prions. The method is therefore of wide application; examples are the immobilisation of (a) insulin secreting pancreatic islet cells, possibly genetically engineered, for transplant or implant for treatment of diabetes; (b) renal epithelial or interstitial cells in renal failure, and (c) autologous vascular endothelial cells, or anticoagulants (heparin, tPA, etc.) on to a synthetic vascular graft (claimed) or polymer coated metallic stent to improve vascular patency. Other diseases treatable by similar means are parkinsonism, or neurological or metabolic deficiency. Non-medical uses are in biosensing, affinity or immunomatrix chromatography, or of bacterial or yeast cells in biotechnology. The release of bioactive species bound covalently is generally not reversible. If release is desired, then a spacer, cleavable by a selective reaction, can be interspersed between the hydrophilic layer and bioactive.

ADVANTAGE - The cross linking of the adsorbed surfactant in situ forms a more physically and chemically stable substrate on which to build the hydrophilic layers. The surfactant layer preferably has free reactive groups after cross-linking, to react with the hydrophilic layer to provide physical and chemical stability for attachment of that layer.

Dwg.0/12

Title Terms: MATERIAL; IMMOBILISE; BIOACTIVE; SPECIES; POLYMERISE;  
SUBSTRATE; COMPRISE; SUPPORT; POLYMERISE; SURFACTANT; ATTACH; SUPPORT;  
CROSS; LINK; SITU; FIRST; LAYER; HYDROPHILIC; POLYMER; SECOND; LAYER;  
CELL; ENZYME; PROTEIN

Index Terms/Additional Words: POLYTETRAFLUORO-ETHYLENE; (PTFE),;  
POLYETHYLENE;; POLYPROPYLENE; POLYETHYLENE; TEREPHTHALATE; POLYURETHANE;  
POLYSTYRENE; POLYSULPHONE; POLYCARBONATE; POLYETHYLENE-CO-VINYL; ACETATE;

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

POLYAMIDE; CELLULOSE; POROUS; POLYESTER; PVA; PEG; PVP; DEXTRAN

Derwent Class: A96; B04; B07; D16; D22; P34; P73

International Patent Class (Main): B32B-005/14; B32B-027/00; C07K-017/08

International Patent Class (Additional): A61L-027/00; B32B-017/06;

C12N-011/08; G01N-033/53

File Segment: CPI; EngPI

Manual Codes (CPI/A-N): A04-E08; A04-E09; A11-C02; A12-W11L; A12-W12C;

B04-B04M; B04-C02D; B04-C03; B11-C; D05-A01A2; D05-A01A5; D05-A01B;

D05-A03A; D05-H10; D09-C01

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M423 M431 M782 M903 N135 Q233 Q421 V000 V500 V560 V600 V611 V752  
V753 V754 V772 V902

\*02\* H7 H713 H721 J0 J011 J2 J271 M210 M211 M212 M262 M272 M281 M320 M416  
M423 M431 M782 M903 M904 M910 Q233 Q606 V743 R00835-M R00835-Q

\*03\* G011 G100 H7 H713 H721 J0 J012 J1 J131 J2 J231 M210 M212 M272 M281  
M320 M414 M423 M431 M510 M520 M531 M540 M782 M903 M904 Q233 Q606  
V743 R22612-M R22612-Q

\*04\* H7 H721 M210 M212 M320 M416 M423 M431 M610 M782 M903 M904 M910 Q233  
Q606 V743 R00326-M R00326-Q

\*05\* H4 H401 H481 H7 H713 H721 H8 M210 M212 M272 M281 M320 M423 M431 M510  
M520 M530 M540 M782 M903 M904 M910 Q233 Q606 V743 R21380-M R21380-Q

\*06\* H6 H601 H607 H609 H684 H689 H7 H721 M280 M312 M321 M332 M344 M363  
M391 M416 M423 M431 M782 M903 M904 M910 Q233 Q606 V743 R00975-M  
R00975-Q

\*07\* H7 H721 M210 M213 M231 M320 M416 M423 M431 M610 M782 M903 M904 M910  
Q233 Q606 V743 R00964-M R00964-Q

\*08\* K0 L4 L463 L499 M280 M312 M313 M314 M315 M323 M332 M342 M383 M393  
M423 M431 M510 M520 M530 M540 M620 M782 M903 M904 Q233 Q606 V743  
R16492-M R16492-Q

\*09\* G010 G100 H7 H715 H721 M210 M212 M240 M281 M320 M414 M423 M431 M510  
M520 M531 M540 M610 M782 M903 M904 M910 Q233 Q606 V743 R00708-M  
R00708-Q

Chemical Fragment Codes (M6):

\*10\* M903 P220 P241 P444 P520 P723 P813 P816 P831 Q233 Q421 Q606 R220  
R530 R535

Polymer Indexing (PS):

<01>

\*001\* 018; R00975 G0022 D01 D12 D10 D51 D53 D59 D69 D82 F- 7A; H0000;  
S9999 S1285-R; S9999 S1309-R; P0511

\*002\* 018; R00326 G0044 G0033 G0022 D01 D02 D12 D10 D51 D53 D58 D82;  
H0000; S9999 S1285-R; P1150 ; P1161

\*003\* 018; R00964 G0044 G0033 G0022 D01 D02 D12 D10 D51 D53 D58 D83;  
H0000; S9999 S1285-R; P1150 ; P1343

\*004\* 018; R00708 G0102 G0022 D01 D02 D12 D10 D19 D18 D31 D51 D53 D58 D76  
D88; H0000; S9999 S1285-R; P1741 ; P1752

\*005\* 018; P0884 P1978 P0839 H0293 F41 D01 D11 D10 D19 D18 D31 D50 D63  
D90 E21 E00; S9999 S1285-R

\*006\* 018; P1592-R F77 D01; S9999 S1285-R

\*007\* 018; P1490-R F61 D01; S9999 S1285-R

\*008\* 018; P0862 P0839 F41 F44 D01 D63; S9999 S1285-R

\*009\* 018; P0635-R F70 D01; S9999 S1285-R

\*010\* 018; R24077-R R01852 G3634 G3623 D01 D03 D11 D10 D23 D22 D31 D42  
D50 D76 D86 F24 F29 F26 F34 H0293 P0599; S9999 S1285-R

\*011\* 018; R00326 G0044 G0033 G0022 D01 D02 D12 D10 D51 D53 D58 D82;  
R00835 G0566 G0022 D01 D11 D10 D12 D51 D53 D58 D63 D84 F41 F89;  
H0022 H0011; S9999 S1285-R; P1150 ; P1310

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

\*012\* 018; P1445-R F81 Si 4A; H0124-R; S9999 S1285-R  
\*013\* 018; R24068 G3714 P0599 D01 F70; S9999 S1285-R  
\*014\* 018; G3725 G3714 P0599 D01 F70; S9999 S1285-R  
\*015\* 018; ND01; Q9999 Q7750; N9999 N7147 N7034 N7023; N9999 N7045 N7034  
N7023; K9676-R; K9574 K9483; N9999 N6882 N6655  
\*016\* 018; B9999 B5221 B4740; B9999 B5141 B4740; B9999 B5243-R B4740;  
N9999 N7090 N7034 N7023; B9999 B5447 B5414 B5403 B5276  
<02>  
\*001\* 018; P0839-R F41 D01 D63; S9999 S1285-R  
\*002\* 018; G2108-R D01 D60 F35; P1978-R P0839 D01 D50 D63 F41; H0000;  
H0011-R; S9999 S1285-R  
\*003\* 018; G2062-R D01 D60 F07 F35; P0635-R F70 D01; H0000; S9999 S1285-R  
\*004\* 018; P1081-R F72 D01; S9999 S1285-R  
\*005\* 018; ND01; Q9999 Q7750; N9999 N7147 N7034 N7023; N9999 N7045 N7034  
N7023; K9676-R; K9574 K9483; N9999 N6882 N6655  
\*006\* 018; B9999 B5221 B4740; B9999 B5243-R B4740; B9999 B5447 B5414  
B5403 B5276; N9999 N7090 N7034 N7023  
<03>  
\*001\* 018; P1707 P1694 D01  
\*002\* 018; R00351 G1558 D01 D23 D22 D31 D42 D50 D73 D82 F47; P8004 P0975  
P0964 D01 D10 D11 D50 D82 F34; P0055; H0000  
\*003\* 018; R00370 G1558 D01 D11 D10 D23 D22 D31 D42 D50 D73 D83 F47;  
P8015 P0975 P0964 D01 D10 D11 D50 D83 F34; P0055; H0000  
\*004\* 018; R00351 G1558 D01 D23 D22 D31 D42 D50 D73 D82 F47; R00370 G1558  
D01 D11 D10 D23 D22 D31 D42 D50 D73 D83 F47; P0975-R P0964 F34 D01  
D10; P0055; H0022 H0011  
\*005\* 018; R01857 R01863 D01 D11 D10 D23 D22 D31 D42 D50 D76 D86 F24 F29  
F26 F34 H0293 P0599 G3623  
\*006\* 018; R07226-R G3623 D01 D23 D22 D31 D42 D50 D61 D76 D86 F24 F28 F26  
F34 F36 F35 H0293 P0599  
\*007\* 018; R00444 G0453 G0260 G0022 D01 D12 D10 D26 D51 D53 D58 D83 F70  
F93; H0000; P0088  
\*008\* 018; G1581 G1558 D01 F47 D11 D10 D23 D22 D31 D73 D42 D50 D83 F27  
F26; P0964-R F34 D01; P0055; H0000  
\*009\* 018; R00446 G0282 G0271 G0260 G0022 D01 D12 D10 D26 D51 D53 D58 D60  
D83 F36 F35; H0000; P0088 ; P0099  
\*010\* 018; R24070 G3623 P0599 D01  
\*011\* 018; G2073 G2062 D01 D60 F07 F35 D11 D10 D50 D86 F09 F36; P1934-R  
P0635 D01 D50 F70; H0000; P1081-R F72 D01  
\*012\* 018; R01176 G1650 G1649 D01 D23 D22 D31 D41 D50 D73 D82 F08 F07 F97  
; P1116 P1105 D01 D10 F07; P0055; H0000  
\*013\* 018; G0635 G0022 D01 D12 D10 D23 D22 D31 D41 D51 D53 D58 D75 D86  
F71; H0000  
\*014\* 018; R01463 G0408 G0384 G0339 G0260 G0022 D01 D11 D10 D12 D26 D51  
D53 D58 D63 D86 F27 F26 F41 F89; H0000; P0088  
\*015\* 018; P1490-R F61 D01  
\*016\* 018; G3623-R P0599 D01  
\*017\* 018; R00326 G0044 G0033 G0022 D01 D02 D12 D10 D51 D53 D58 D82;  
P1332 P1694; H0011-R; P1150  
\*018\* 018; R00835 G0566 G0022 D01 D11 D10 D12 D51 D53 D58 D63 D84 F41 F89  
; P1718 P1694; H0000  
\*019\* 018; R00817 G0475 G0260 G0022 D01 D12 D10 D26 D51 D53 D58 D83 F12;  
R00444 G0453 G0260 G0022 D01 D12 D10 D26 D51 D53 D58 D83 F70 F93;  
H0022 H0011; P0088  
\*020\* 018; R00817 G0475 G0260 G0022 D01 D12 D10 D26 D51 D53 D58 D83 F12;  
R00446 G0282 G0271 G0260 G0022 D01 D12 D10 D26 D51 D53 D58 D60 D83

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

F36 F35; R00444 G0453 G0260 G0022 D01 D12 D10 D26 D51 D53 D58 D83  
F70 F93; H0033 H0011; P0088  
\*021\* 018; R00975 G0022 D01 D12 D10 D51 D53 D59 D69 D82 F- 7A; P1730  
P1694 D01; H0011-R; H0113 H0011  
\*022\* 018; G0635 G0022 D01 D12 D10 D23 D22 D31 D41 D51 D53 D58 D75 D86  
F71; R00975 G0022 D01 D12 D10 D51 D53 D59 D69 D82 F- 7A; R00444  
G0453 G0260 G0022 D01 D12 D10 D26 D51 D53 D58 D83 F70 F93; R00446  
G0282 G0271 G0260 G0022 D01 D12 D10 D26 D51 D53 D58 D60 D83 F36 F35  
; R00326 G0044 G0033 G0022 D01 D02 D12 D10 D51 D53 D58 D82; R00835  
G0566 G0022 D01 D11 D10 D12 D51 D53 D58 D63 D84 F41 F89; R01463  
G0408 G0384 G0339 G0260 G0022 D01 D11 D10 D12 D26 D51 D53 D58 D63  
D86 F27 F26 F41 F89; H0011-R; P1150 ; P0088  
\*023\* 018; ND01; Q9999 Q7750; N9999 N7147 N7034 N7023; N9999 N7045 N7034  
N7023; K9676-R; K9574 K9483; N9999 N6882 N6655  
\*024\* 018; K9472; K9541 K9483; B9999 B4988-R B4977 B4740  
\*025\* 018; D01 D12 D10 D22-R D42 D51-R D59 D58 D63 D64 D65 D69 F78 F73  
F47 F40 F39 F41-R 7A-R F22 F07-R D60 F26-R F04 F72 D41 E01 E00;  
R00927 G1503 D01 D11 D10 D50 D85 F22; A999 A157-R  
<04>  
\*001\* 018; P1707 P1694 D01  
\*002\* 018; G2073 G2062 D01 D60 F07 F35 D11 D10 D50 D86 F09 F36; P1934-R  
P0635 D01 D50 F70; H0000; P1081-R F72 D01  
\*003\* 018; R00446 G0282 G0271 G0260 G0022 D01 D12 D10 D26 D51 D53 D58 D60  
D83 F36 F35; H0000; P0088 ; P0099  
\*004\* 018; R00817 G0475 G0260 G0022 D01 D12 D10 D26 D51 D53 D58 D83 F12;  
R00446 G0282 G0271 G0260 G0022 D01 D12 D10 D26 D51 D53 D58 D60 D83  
F36 F35; R00444 G0453 G0260 G0022 D01 D12 D10 D26 D51 D53 D58 D83  
F70 F93; H0033 H0011; P0088  
\*005\* 018; R01463 G0408 G0384 G0339 G0260 G0022 D01 D11 D10 D12 D26 D51  
D53 D58 D63 D86 F27 F26 F41 F89; H0000; P0088  
\*006\* 018; G0635 G0022 D01 D12 D10 D23 D22 D31 D41 D51 D53 D58 D75 D86  
F71; H0000  
\*007\* 018; R00351 G1558 D01 D23 D22 D31 D42 D50 D73 D82 F47; P8004 P0975  
P0964 D01 D10 D11 D50 D82 F34; P0055; H0000  
\*008\* 018; R07226-R G3623 D01 D23 D22 D31 D42 D50 D61 D76 D86 F24 F28 F26  
F34 F36 F35 H0293 P0599  
\*009\* 018; G3623-R P0599 D01  
\*010\* 018; R24070 G3623 P0599 D01  
\*011\* 018; R01176 G1650 G1649 D01 D23 D22 D31 D41 D50 D73 D82 F08 F07 F97  
; P1116 P1105 D01 D10 F07; P0055; H0000  
\*012\* 018; R00815 G0715 G0022 D01 D12 D10 D27 D51 D53 D58 D83 F08 F07;  
H0000  
\*013\* 018; G0419 G0384 G0339 G0260 G0022 D01 D12 D10 D26 D51 D53 D58 D63  
F41 F89 D11 D86 F08 F07; H0000; P0088  
\*014\* 018; R00808 G0497 G0260 G0022 D01 D12 D10 D26 D51 D53 D58 D83 F22;  
H0000; P0088  
\*015\* 018; G0373 G0340 G0339 G0260 G0022 D01 D12 D10 D26 D51 D53 D58 D63  
F41 F89 D23 D22 D31 D75 D41 D87 F72 E11 E00; H0000; P0088  
\*016\* 018; G0635 G0022 D01 D12 D10 D23 D22 D31 D41 D51 D53 D58 D75 D86  
F71; R00446 G0282 G0271 G0260 G0022 D01 D12 D10 D26 D51 D53 D58 D60  
D83 F36 F35; R00444 G0453 G0260 G0022 D01 D12 D10 D26 D51 D53 D58  
D83 F70 F93; R00817 G0475 G0260 G0022 D01 D12 D10 D26 D51 D53 D58  
D83 F12; R01463 G0408 G0384 G0339 G0260 G0022 D01 D11 D10 D12 D26  
D51 D53 D58 D63 D86 F27 F26 F41 F89; R00815 G0715 G0022 D01 D12 D10  
D27 D51 D53 D58 D83 F08 F07; G0419 G0384 G0339 G0260 G0022 D01 D12  
D10 D26 D51 D53 D58 D63 F41 F89 D11 D86 F08 F07; G0373 G0340 G0339

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



G0260 G0022 D01 D12 D10 D26 D51 D53 D58 D63 F41 F89 D23 D22 D31 D75  
D41 D87 F72 E11 E00; H0011-R; P0088  
\*017\* 018; R01463 G0408 G0384 G0339 G0260 G0022 D01 D11 D10 D12 D26 D51  
D53 D58 D63 D86 F27 F26 F41 F89; G0340-R G0339 G0260 G0022 D01 D12  
D10 D26 D51 D53 D58 D63 F41 F89 D69 F- 7A; H0011-R; P0088  
\*018\* 018; ND01; Q9999 Q7750; N9999 N7147 N7034 N7023; N9999 N7045 N7034  
N7023; K9676-R; K9574 K9483; N9999 N6882 N6655  
\*019\* 018; B9999 B3407 B3383 B3372  
<05>  
\*001\* 018; P0782 F39 D01 D65  
\*002\* 018; G2108-R D01 D60 F35; P1978-R P0839 D01 D50 D63 F41; H0000;  
H0011-R  
\*003\* 018; G2062-R D01 D60 F07 F35; P0635-R F70 D01; H0000  
\*004\* 018; R00351 G1558 D01 D23 D22 D31 D42 D50 D73 D82 F47; P8004 P0975  
P0964 D01 D10 D11 D50 D82 F34; P0055; H0000  
\*005\* 018; ND01; Q9999 Q7750; N9999 N7147 N7034 N7023; N9999 N7045 N7034  
N7023; K9676-R; K9574 K9483; N9999 N6882 N6655  
Derwent Registry Numbers: 0326-S; 0326-U; 0708-S; 0708-U; 0835-S; 0835-U;  
0964-S; 0964-U; 0975-S; 0975-U; 1842-S; 1842-U  
Specific Compound Numbers: R00835-M; R00835-Q; R22612-M; R22612-Q; R00326-M  
; R00326-Q; R21380-M; R21380-Q; R00975-M; R00975-Q; R00964-M; R00964-Q;  
R16492-M; R16492-Q; R00708-M; R00708-Q

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2004 Thomson Derwent. All rights reserved.

© 2004 Dialog, a Thomson business

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Übersetzung der  
europäischen Patentschrift**

⑨⑦ **EP 0910584 B 1**

⑩ **DE 697 05 841 T 2**

⑤① Int. Cl. 7:  
**C 07 K 17/08**  
C 12 N 11/08  
A 61 L 27/00

②① Deutsches Aktenzeichen:	697 05 841.7
⑧⑤ PCT-Aktenzeichen:	PCT/US97/09634
⑨⑥ Europäisches Aktenzeichen:	97 927 968.4
⑧⑦ PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO.97/46590
⑧⑥ PCT-Anmeldetag:	2. 6. 1997
⑧⑦ Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	11. 12. 1997
⑨⑦ Erstveröffentlichung durch das EPA:	28. 4. 1999
⑨⑦ Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	25. 7. 2001
④⑦ Veröffentlichungstag im Patentblatt:	4. 4. 2002

③① **Unionspriorität:**

660698	03. 06. 1996	US
863263	27. 05. 1997	US

⑦③ **Patentinhaber:**

Gore Enterprise Holdings, Inc., Newark, Del., US

⑦④ **Vertreter:**

Klunker, Schmitt-Nilson, Hirsch, 80797 München

⑧④ **Benannte Vertragsstaaten:**

DE, FR, GB, IT, SE

⑦② **Erfinder:**

DRUMHELLER, D., Paul, Flagstaff, US

⑤④ **MATERIALIEN UND VERFAHREN ZÜR IMMOBILISIERUNG VON BIOAKTIVEN SPEZIEN AUF POLYMERISCHEN  
UNTERLAGEN.**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 697 05 841 T 2

DE 697 05 841 T 2

24.10.01

EP 97 927 968.4

K 52 348/7

5

Diese Anmeldung ist eine continuation-in-part der ebenfalls anhängigen Anmeldung mit der Seriennummer 08/660,698, eingereicht am 3. Juni 1996.

#### Gebiet der Erfindung

10

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein immobilisierte chemisch funktionelle Gebilde. Genauer betrifft die Erfindung Materialien und Verfahren für die Immobilisierung bioaktiver Spezies auf polymeren Substraten.

#### Hintergrund der Erfindung

15

20

25

30

Auf den Gebieten der Biotechnologie, Biomedizin und Bioheilung beispielsweise werden bioaktive Spezies oft auf einem Trägerbestandteil immobilisiert, um die bioaktive Spezies effizienter zu nutzen. Der Begriff "Immobilisieren" und seine Ableitungen, wie er hierin verwendet wird, betrifft die Bindung einer bioaktiven Spezies direkt an einen Trägerbestandteil oder über mindestens eine Zwischenverbindung an einen Trägerbestandteil. Der Begriff "binden" und seine Ableitungen, wie hierin verwendet, betreffen Adsorption wie Physisorption oder Chemisorption, Ligand/Rezeptor-Wechselwirkung, kovalente Bindung, Wasserstoff-Bindung oder ionische Bindung einer polymeren Substanz oder einer bioaktiven Spezies an einen Trägerbestandteil. Zu bioaktiven Spezies gehören beispielsweise Enzyme, organische Katalysatoren, Ribozyme, organometallische Verbindungen, Proteine, Glycoproteine, Peptide, Polyaminosäuren, Antikörper, Nucleinsäuren, Steroidmoleküle, Antibiotika, Antimykotika, Cytokine, Kohlehydrate, oleophobe Verbindungen, Lipide, Pharmazeutika und Therapeutika. Zellen wie Säugetierzellen, Reptilzellen, Amphibienzellen, Vogelzellen, Insektenzellen, Planktonzellen, Zellen von Wirbeltieren und wirbellosen Tieren des Meeres, die keine Säuger sind, Pflanzenzellen, Mikrobenzellen, Einzeller, genetisch

veränderte Zellen und Organellen wie Mitochondrien sind ebenfalls bioaktive Spezies. Außerdem werden nicht-zelluläre biologische Gebilde wie Viren, Viroide und Prionen als bioaktive Spezies betrachtet.

5 Es gibt verschiedene Materialien, die zur Verwendung als ein Trägerbestandteil zur Immobilisierung bioaktiver Spezies geeignet sind. Beispiele für diese Materialien sind Kohlenwasserstoff-Polymere, Fluorkohlenstoff-Polymere, Keramiken und Metalle. Unter diesen Materialien sind Polytetrafluorethylen und poröses Polytetrafluorethylen von speziellem Interesse als  
10 Trägerbestandteile. Polytetrafluorethylen (PTFE) ist ein hydrophobes Fluorkohlenstoff-Polymer, das wohlbekannt dafür ist, eine außerordentliche Beständigkeit gegen Lösungsmittel- und chemischen Angriff zu haben. Poröses Polytetrafluorethylen kann auf eine Vielzahl von Wegen hergestellt werden. Koextrusion eines Polytetrafluorethylen-Extrudats mit einem leicht verdampfbaren Material wie Petrolether, beispielsweise, bildet ein Material, aus dem das leicht verdampfbare Material letztlich entfernt wird, um das Material poröser zu machen (siehe US-Patent Nr. 3,281,511, das hierin durch  
15 Bezugnahme aufgenommen wird). Expandiertes Polytetrafluorethylen (ePTFE) oder gerecktes Polytetrafluorethylen sind poröse Fluorkohlenstoff-Polymermaterialien, die in erster Linie durch eine Vielzahl verbindender Hohlräume, definiert durch Knoten und Fibrillen aus Polytetrafluorethylen-Material, gekennzeichnet sind. Expandierte PTFE-Materialien, einschließlich ePTFE-Membranen und -Filme, die nachstehend beschrieben werden, können nach den Lehren der US-Patente Nr. 3,953,566, 3,962,153,  
20 4,096,227, 4,187,390 und 4,902,423, von denen jedes durch Bezugnahme hierin aufgenommen wird, hergestellt werden. Im Allgemeinen sind poröse PTFE-Materialien chemisch stabil und sehr biokompatibel. Die Materialien haben leicht einzustellende Porengrößen mit großen Oberfläche/Volumen-Verhältnissen, guter mechanischer Festigkeit und guter Beständigkeit gegen  
25 Verschmutzung, unter anderen Eigenschaften. Dementsprechend sind diese Materialien als Trägerbestandteile für die Immobilisierung bioaktiver Spezies attraktiv.

In der Literatur wurden mehrere Verfahren zur Immobilisierung bioaktiver Spezies auf Fluorkohlenstoff-Polymere wie PTFE, poröses PTFE oder polymere Kohlenwasserstoff-Materialien gelehrt. Zu diesen Verfahren gehören beispielsweise chemische Veränderungen des polymeren Materials, um darauf chemisch reaktive Gruppen zur kovalenten Bindung einer bioaktiven Spezies an das Material auszubilden, Adsorption einer bioaktiven Spezies an das polymere Material, und Verändern des polymeren Materials und/oder einer bioaktiven Spezies mit Kompatibilitätsförderern, oberflächenaktiven Mitteln oder Netzmitteln, um ihre Oberflächenenergien zu verändern. Wie nachstehend beschrieben wird, gibt es bei jedem dieser Verfahren Schwierigkeiten.

Wegen der extremen chemischen Inertheit des Rückgrats von Fluorkohlenstoff-Polymeren und vielen Kohlenwasserstoff-Polymeren können nur hoch-energetische Reaktionstypen das Rückgrat dieser Materialien erfolgreich verändern, um darauf chemisch reaktive organische Baueinheiten zu erzeugen. Wenn chemisch reaktive organische Baueinheiten entlang des Rückgrats eines Fluorkohlenstoff- oder Kohlenwasserstoff-Polymers gebildet werden, können bioaktive Spezies an die Baueinheiten gebunden werden. Beispielsweise wurden Enzyme chemisch an mit Ammoniakplasma behandelte Fluorpolymer-Oberflächen gebunden unter Verwendung von Ammoniakplasma und Glutaraldehyd (Siehe M. Kawakami, H. Koya und S. Gondo, "Immobilization of glucose oxidase on polymer membranes treated by low-temperature plasma", Biotech. Bioeng., 32: 369, (1988)) oder unter Verwendung von Aminosilan und Glutaraldehyd (J. M. Taylor, M. Cheryan, T. Richardson und N. F. Olson, "Pepsin immobilized on inorganic supports for the continuous coagulation of skim milk", Biotech. Bioeng., 19: 683 (1977), beispielsweise). Repräsentative Beispiele für diese hochenergetischen Reaktionen sind thermische Zersetzung (US-Patent Nr. 5,296,510, Shigeru et al. erteilt), Bestrahlung mit Elektronen, Gammastrahlen, Radiowellen, Mikrowellen (T. Kasemura, S. Ozawa, K. Hattori, "Surface Modification of Fluorinated Polymers of Microwave Plasmas", J. Adhesion, 33: 33 (1990); Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation in

PCT/AU89/00220; Y. Ito, Y. Iguchi, T. Kashiwagi, Y. Imanishi, "Synthesis and nonthrombogenicity of polyetherurethaneurea film grafted with poly(sodium vinyl sulfonate)", J. Biomed. Mater. Res., 25: 1347 (1991); und Y. Ito, M. Kajihara, Y. Imanishi, "Materials for enhancing cell adhesion by immobilization of cell adhesive peptide", J. Biomed. Mater. Res., 25: 1325 (1991)), oder mit UV-Licht (K. Allmer, A. E. Feiring, "Photochemical Modification of a Fluoropolymer Surface", Macromolecules, 24: 5487 (1991); A. B. Pointer, W. R. Jones Jr., R. H. Janse, "Surface energy changes produced by ultraviolet-ozone irradiation of poly(methyl methacrylate), polycarbonate, and polytetrafluoroethylen", Polym. Eng. Sci., 34: 1233 (1994)), Glimmentladungs-Bestrahlung (R. Sipehia, G. Martucci, M. Barbarosie, C. Wu, "Enhanced Attachment of and Growth of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins on Ammonia Plasma Modified Surfaces of PTFE and ePTFE Synthetic Vascular Graft Biomaterials", Biomater. Art. Cells Immob. Biotech., 21: 455 (1993)) und Redox-Reaktionen mit starken Nucleophilen wie Natrium- oder Kalium-Aryloxiden (C. A. Costello, T. J. McCarthy, "Surface-selective Introduction of Specific Functionalities onto Poly(tetrafluoroethylene)", Macromolecules, 20: 2819 (1987); A. J. Dias, T. J. McCarthy, "Introduction of carboxylic acid, aldehyde and alcohol functional groups onto the surface of poly(chlorotrifluoroethylene)", Macromolecules, 20: 2068 (1987); G. E. Sweet, J. P. Bell, "Selective chemical etching of poly(ethylene terephthalate) using primary amines", J. Polym. Sci. Phys. Ed., 16: 1935 (1978); und H. B. Lin, S. L. Cooper, "Polyurethane copolymers containing covalently attached RGD-peptide", Mat. Res. Soc. Symp. Proc., 252: 185 (1992)), oder Ozon (R. L. Daubendiek, J. G. Calvert, "The Reaction of Ozone with Perfluorinated Polyolefins", Environ. Lett., 6: 253 (1974)).

Diese Hochenergie-Veränderungen können jedoch für polymere Materialien hochgradig zerstörerisch sein. Bei PTFE und porösem PTFE beispielsweise führen Hochenergie-Veränderungen des Fluorkohlenstoff-Rückgrats oft zu unkontrollierter Oberflächen-Erosion des Materials, Depolymerisierung des Perfluorkohlenstoff-Rückgrats (A. B. Pointer, W. R. Jones Jr., R. H. Jansen,

"Surface Energy Changes Produced by Ultraviolet-ozone Irradiation of Poly(methyl methacrylate), Polycarbonate and Polytetrafluoroethylene", Polym. Eng. Sci., 34: 1233 (1994)), Verringerung der Festigkeit des Polymer-Substrats (S. Kanazawa, T. Takiguchi, A. Nishimura, T. Morita und A. Uno, "Development of a Hydrophilic PTFE porous membrane filter", Sumitomo Denki, 147: 99 (Sept. 1995), und zu Verlust an definierter Fibrillen-Struktur von porösem expandiertem PTFE (US-Patent Nr. 5,462,781, Zukowski erteilt).

Außerdem erzeugen Hochenergie-Veränderungen an Kohlenwasserstoff-Polymeren und Fluorkohlenstoff-Polymeren wie PTFE oder porösem PTFE oft reaktive Zusammensetzungen an dem Kohlenwasserstoff- oder Fluorkohlenstoff-Rückgrat, die eine unbestimmbare Oberflächendichte, chemische Identität und chemische Stabilität haben (X. Xie, T. R. Gengenbach und H. J. Griesser, "Changes in wettability with time of plasma modified perfluorinated polymers", J. Adhesion Sci. Technol., 6: 1411 (1992). Außerdem kann die Veränderung des Kohlenwasserstoff- oder Perfluorkohlenstoff-Rückgrats räumlich ungleich sein, wobei mikroskopische oder makroskopische Bereiche des Polymers unverändert bleiben. Bestenfalls können diese Oberflächen-Zusammensetzungen nur empirisch bestimmt werden und so nur teilweise bekannt sein.

Bei einem hydrophoben porösen Polymer wie beispielsweise ePTFE oder porösem Polyethylen kann die Veränderung des Rückgrats auf die äußeren Schichten des porösen Materials beschränkt sein, wobei die inneren Porenstrukturen größtenteils oder völlig unverändert bleiben. Als Ergebnis bleiben die unveränderten Bereiche des Polymer-Trägerbestandteils hydrophob und unterstützen so nicht ohne weiteres das Benetzen mit Flüssigkeiten hoher Oberflächenspannung. Beim Fehlen einer derartigen Benetzung kann eine kontinuierliche Durchführung von Fluiden hoher Oberflächenspannung durch den Trägerbestandteil zwecks Materialtransport von Reaktanden oder Nährstoffen zu oder von einer immobilisierten bioaktiven Spezies nicht begonnen oder aufrechterhalten werden. Unterbrochene oder unvollständige



Durchführung von Fluid-Phasen hoher Oberflächenspannung in einem porösen Polymer-Trägerbestandteil kann zum Tunneln des Fluidums hoher Oberflächenspannung durch nur Teile des porösen Materials führen, was zu verringerter Effizienz führt. Darüber hinaus können diese unveränderten Bereiche nicht mit bioaktiven Spezies immobilisiert werden, was zu ineffizienter Verwendung der hohen Oberfläche des porösen Materials führt.

Wegen diesen Einschränkungen ist die Veränderung des Rückgrats eines Kohlenwasserstoff- oder Fluorkohlenstoff-Polymer-Trägerbestandteils mit einer hochenergetischen Reaktion meist ein ungeeignetes Verfahren zur Immobilisierung von bioaktiven Spezies.

Als eine Alternative zu diesen chemischen Veränderungen polymerer Oberflächen wurden nicht-chemische Verfahren verwendet, um bioaktive Spezies an Kohlenwasserstoff- und Fluorkohlenstoff-Trägerbestandteile zu binden. Beim einfachsten Verfahren wird eine bioaktive Spezies via einfache physikochemische Adsorption an den Oberflächen eines Fluorkohlenstoff-Polymers immobilisiert. Beispielsweise lehren M. Rucha, B. Turkiewicz und J. S. Zuk, "Polymeric membranes for lipase immobilization", J. Am. Oil Chem. Soc., 67: 887 (1990) und Shults, M. et al., "Continuous *In Vivo* Glucose Analysis Based on Immobilized Enzyme Bound To Derivatized Teflon Membrane", Trans. ASAI, 25: 66 (1979) beide Enzym-Physisorption auf ePTFE. Physisorption bioaktiver Spezies ist jedoch oft kinetisch und thermodynamisch instabil, hochgradig reversibel und kompetitiv verdrängt durch Reaktanden, Produkte oder Nährstoffe in gelöster Phase. Außerdem kann Physisorption die bioaktive Spezies verändern oder schädigen. Daher ist die Physisorption bioaktiver Spezies an Kohlenwasserstoff-Polymer- oder Fluorkohlenstoff-Polymer-Trägerbestandteile üblicherweise nicht eine geeignete Immobilisierungs-Technik. Außerdem verhindern die hydrophoben Eigenschaften eines Trägerbestandteils aus porösem Kohlenwasserstoff-Polymer oder porösem Fluorkohlenstoff-Polymer wie ePTFE oft die Physisorption einer bioaktiven Spezies in den inneren Porenstrukturen des Trägerbestandteils.

5 Nach einem anderen nicht-chemischen Immobilisations-Schema wurden  
bioaktive Spezies wie Zellen an porösen PTFE-Trägerbestandteilen immobi-  
lisiert. Beispielsweise wurden Bakterien- und Hefe-Zellen unter Verwen-  
dung einer Emulsion aus PTFE und oberflächenaktiven Mitteln in PTFE-  
Fibrillenmatrizes immobilisiert (F. W. Hyde, G. R. Hunt und L. A. Errede,  
"Immobilization of bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in po-  
ly(tetrafluorethylene) membranes", Appl. Environ. Microbial., 57: 219  
10 (1991)). Das oberflächenaktive Mittel ist notwendig, um die Anwesenheit  
einer kontinuierlichen Wasserphase überall in der Emulsion sicherzustellen,  
um die Diffusion von Nährstoffen zu Zellen, die in den porösen Bereichen  
des Materials immobilisiert sind, zu erlauben. Dieses Verfahren zur Immo-  
bilisierung von Zellen in den porösen Matrizes eines Fluorkohlenstoff-Poly-  
mers ist ziemlich scharf, jedoch sind ebenso viele oberflächenaktive Mittel  
15 cytotoxisch. Als Ergebnis ist dieses Verfahren nicht allgemein anwendbar  
auf alle Zell-Typen, weil die Reaktionsbedingungen oft für Zell-Typen wie  
Pflanzen- oder Säugetier-Zellen toxisch sind. Außerdem kann das oberflä-  
chenaktive Mittel etwas von dem Hohlraum-Volumen oder das gesamte  
Hohlraum-Volumen der Poren in einem solchen porösen Trägerbestandteil  
20 verstopfen. Schließlich kann sich das oberflächenaktive Mittel mit der Zeit  
aus dem Trägerbestandteil herauslösen. Dies schafft oft eine toxische Um-  
gebung für die immobilisierten Zellen oder ein Tunneln von Nährstoffen,  
was zu einer heterogenen Verteilung von Zellen in dem porösen Träger-  
bestandteil führt. Folglich ist dies oft ein ungeeignetes Verfahren für die  
25 Immobilisierung von bioaktiven Spezies.

In noch einem anderen nicht-chemischen Verfahren wurden Säugetier-  
Zellen in ePTFE-Trägerbestandteilen immobilisiert, indem die Zellen durch  
hydrostatischen Druck in die Poren des Materials gezwungen wurden (Uni-  
30 versität of Washington, PCT/US95/03735). Die Zell-Lebensfähigkeit ist je-  
doch oft gering wegen der mechanischen Scherkräfte, die während des Ver-  
fahrens erzeugt werden. Außerdem bleibt das ePTFE hydrophob und der  
Material-Transport von flüssigem Wasser durch die Dicke des Materials

kann niedrig bleiben, was zu einem suboptimalen Transport von Nährstoffen zu den immobilisierten Zellen führt.

5 In einem Versuch, die Immobilisierung bioaktiver Spezies, die an Kohlenwasserstoff- oder Fluorkohlenstoff-Polymer-Trägerbestandteile immobilisiert sind, zu verbessern, kann die Hydrophobie der Oberflächen derartiger Polymer-Trägerbestandteile mit hydrophilen oberflächenaktiven Mitteln oder grenzflächenaktiven Mitteln verändert werden. Hydrophobe Oberflächen sind niederenergetische Oberflächen, die leicht benetzt werden von Fluiden niedriger Oberflächenspannung wie Kohlenwasserstoffen oder Alkoholen mit niedrigerem Molekulargewicht und den meisten organischen Lösungsmitteln mit niedrigerem Molekulargewicht, wie Benzol, Aceton, Toluol und Dioxan etc. Hydrophile Oberflächen andererseits sind hochenergetische Oberflächen, die von Fluiden hoher Oberflächenspannung leicht benetzt werden. Beispiele für Fluide hoher Oberflächenspannung sind, aber ohne darauf beschränkt zu sein, flüssiges Wasser, wässrige Salz- und Proteinlösungen, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Glycerol, Hexamethylphosphortriamid, Formamid und Glykol, beispielsweise. Bei diesen Verfahren werden die grenzflächenaktiven Mittel auf den Oberflächen eines polymeren Kohlenwasserstoff- oder Fluorkohlenstoff-Trägerbestandteils physisorbiert. Wenn ein grenzflächenaktives Mittel auf die Oberflächen eines hydrophoben polymeren Trägerbestandteils aufgebracht wird, wird die Oberflächenenergie des Trägerbestandteil üblicherweise erhöht. Die erhöhte Oberflächenenergie des Trägerbestandteils erleichtert oft die Bindung einer bioaktiven Spezies an den Trägerbestandteil. Beispielsweise lehren die US-Patente Nr. 5,077,215, das McAuslan et al. erteilt wurde, Nr. 5,183,545, das Branca et al. erteilt wurde, und Nr. 5,203,997, das Koyama et al. erteilt wurde, die Adsorption von anionischen und nichtionischen grenzflächenaktiven Mitteln aus Fluorkohlenstoff an der Oberfläche von Fluorkohlenstoff-Trägerbestandteilen, um ihre Hydrophobie zu verändern. Als ein Ergebnis wurde die normalerweise hydrophobe Oberfläche des Polymers hydrophiler gemacht. Dem folgte die Physisorption einer bioaktiven Spezies an der Polymer-Oberfläche, die durch das grenzflächenaktive Mittel modifiziert war.

10  
15  
20  
25  
30

In ähnlichen Verfahren wird die Adsorption von grenzflächenaktiven Mitteln an polymere Trägerbestandteile gelehrt, bei denen nachfolgend bioaktive Spezies an die adsorbierten grenzflächenaktiven Mittel gebunden werden. Beispielsweise lehrt das Guire et al. erteilte US-Patent Nr. 5,263,992 die Adsorption von Polymerketten an einen Trägerbestandteil, woran Biomoleküle über ein fotoaktives Mittel gebunden werden. Auf diese Weise wurden bioaktive Spezies leichter an dem Trägerbestandteil immobilisiert, als wenn sie direkt an der darunter liegenden hydrophoben Polymeroberfläche immobilisiert würden. Alternativ können die bioaktiven Spezies kovalent direkt an das oberflächenaktive Mittel gebunden werden, anstatt daran physisorbiert zu werden (siehe auch beispielsweise das Hato et al. erteilte US-Patent Nr. 4,619,897).

Bei diesen Verfahren sorgte die Anwesenheit eines grenzflächenaktiven Mittels für eine Oberfläche mit einer Hydrophilie, die zu Anfang die Immobilisierung bioaktiver Spezies erhöhte. Bei porösen Trägerbestandteilen sorgte das grenzflächenaktive Mittel auch zu Beginn für kontinuierliche Wasserphasen durch die Poren des Trägerbestandteils. Wie nachstehend detaillierter beschrieben wird, ist jedoch die Immobilisierung bioaktiver Spezies mit grenzflächenaktiven Mitteln üblicherweise zeitlich instabil.

Die physikalisch-chemische Stabilität der immobilisierten bioaktiven Spezies ist eine andere Angelegenheit, wenn bioaktive Spezies mit grenzflächenaktiven Mitteln immobilisiert werden. Die Adsorption von grenzflächenaktiven Mitteln an einen polymeren Trägerbestandteil kann dazu dienen, die Festigkeit der Biospezies-Adsorption zu erhöhen, aber die Biospezies kann trotzdem von der mit grenzflächenaktivem Mittel behandelten Oberfläche desorbieren. Um die Rückhaltung der bioaktiven Spezies an einem Trägerbestandteil zu verbessern, lehrt das d'Eveleigh erteilte US-Patent Nr. 4,885,250 die Veränderung biologischer Liganden selbst mit grenzflächenaktiven Mitteln vor der Physisorption des grenzflächenaktiven Mittels an dem Trägerbestandteil. Die Veränderung bioaktiver Spezies mit grenzflä-

chenaktiven Mitteln vor der Physisorption an hydrophobe Polymer-Oberflächen kann jedoch die Bioaktivität der bioaktiven Spezies dramatisch beeinträchtigen. Beispielsweise wurde das Enzym Lactat-dehydrogenase mit grenzflächenaktiven Mitteln gemischt und an PTFE-Mikropartikeln physisorbiert, was zu einem Abfall der enzymatischen Aktivität von 96 % führte (N. D. Danielson und R. W. Siegiej, "Immobilization of enzymes on polytetrafluoroethylene particles packed in HPLC columns", Biotech. Bioeng. 23: 1913 (1981)). In einem anderen Beispiel wurde das Enzym Urease mit Perfluoralkyl-Ketten verändert und dann an ePTFE physisorbiert, was zu einem anfänglichen Abfall der enzymatischen Aktivität von 10 - 18 % und einer schlechten enzymatischen Stabilität insgesamt führte (R. K. Kobos, J. W. Eveleigh, M. L. Stepler, B. J. Haley, S. L. Papa, "Fluorocarbon-Based Immobilization Method for Preparation of Enzyme Electrodes", Anal. Chem. 60: 1996 (1988)). Außerdem können adsorbierte, mit grenzflächenaktivem Mittel modifizierte bioaktive Spezies molekular beweglich bleiben und können an der Oberfläche eines Kohlenwasserstoff-Polymer- oder Fluorkohlenstoff-Polymer-Trägerbestandteils wandern und sich zusammenballen. Diese Wirkung kann beschleunigt werden bei der Anwendung von Verschnittmitteln, Veränderungen des pH oder erhöhten Temperaturen, wie beim Behandeln im Autoklaven, was oft zu einer beträchtlichen Umorganisierung der bioaktiven Spezies an der Oberfläche des Trägerbestandteils führt. Dies kann einen Verlust der Benetzungsfähigkeit des Trägerbestandteils mit Flüssigkeiten hoher Oberflächenspannung und/oder eine ungleiche räumliche Immobilisierung einer bioaktiven Spezies bewirken (Abaysekara et al., erteiltes US-Patent Nr. 5,352,511). Als ein Ergebnis dieser Einschränkungen ist die Veränderung einer bioaktiven Spezies mit einem grenzflächenaktiven Mittel vor dem Immobilisieren der bioaktiven Spezies an einem hydrophoben Trägerbestandteil meistens ein ungeeignetes Verfahren.

Grenzflächenaktive Mittel, ob an einem hydrophoben Trägerbestandteil physisorbiert oder an eine bioaktive Spezies gebunden und dann an einen hydrophoben Trägerbestandteil adsorbiert, unterliegen der Desorption. Beispielsweise lehren R. I. Foster et al. in "Analysis of Urokinase Immobilizati-

on on the polytetrafluoroethylene vascular prosthesis", Am. J. Surg., 156: 130 (1988) die Adsorption des grenzflächenaktiven Kohlenwasserstoffs Tridecylmethyl-ammoniumchlorid an die Oberflächen von ePTFE, gefolgt von Immobilisierung des Enzyms Urokinase an das grenzflächenaktive Mittel. Die Adsorption war instabil, und das Konstrukt aus Enzym/grenzflächenaktivem Mittel wurde schließlich verdrängt. Eine zusätzliche Beschränkung bei diesem Immobilisierungs-Verfahren ist die Tendenz des grenzflächenaktiven Mittels, sich in die gelöste Phase hinein zu lösen, oft mit unerwünschten Folgen, wie Kontaminierung oder Inaktivierung gewünschter Produkte oder der bioaktiven Spezies. Dementsprechend ist die Immobilisierung bioaktiver Spezies an einen hydrophoben Trägerbestandteil mit einem grenzflächenaktiven Mittel üblicherweise instabil, kurzlebig und möglicherweise für die bioaktive Spezies schädlich.

Die Stabilität der Adsorption von grenzflächenaktiven Mitteln an eine Kohlenwasserstoff- oder Fluorkohlenstoff-Polymer-Oberfläche kann erhöht werden durch Erhöhen des Molekulargewichts des grenzflächenaktiven Mittels (J. H. Lee, J. Kopecek, J. D. Andrade, "Protein-Resistant Surfaces Prepared by PEO-Containing Block Copolymer Surfactants", J. Biomed. Mater. Res., 23: 351 (1989)) oder durch Erniedrigen der molekularen Entropie des grenzflächenaktiven Mittels (J. H. Lee, P. Kopeckova, J. Kopecek, J. D. Andrade, "Surface Properties of Alkyl Methacrylates with Methoxy(polyethylene oxide) Methacrylates and Their Application as Protein-resistant Coatings", Biomaterials, 11:455 (1990)). Beide Wege können durchgeführt werden durch Herstellen von grenzflächenaktiven Mitteln mit verzweigten oder kammartigen Kohlenwasserstoff-Ketten anstelle von beispielsweise linearen Kohlenwasserstoff-Ketten. Die Stabilität des adsorbierten grenzflächenaktiven Mittels kann dennoch noch vorübergehend sein, wenn auch viel fester, und kann dennoch von der Träger-Oberfläche desorbieren, was diese Technik für Langzeit-Anwendungen möglicherweise unbrauchbar macht.

Bei einem anderen Verfahren zur Verringerung der Desorption des grenzflächenaktiven Mittels oder der Beweglichkeit des grenzflächenaktiven Mittels können adsorbierte Ketten des grenzflächenaktiven Mittels kovalent mit benachbarten adsorbierten Ketten des grenzflächenaktiven Mittels vernetzt werden, was neue oberflächengebundene planare Moleküle erzeugt. Die sich ergebenden planaren Moleküle sind von sehr hohem Molekulargewicht und haben eine stark verringerte molekulare Entropie. Diese Art von Vernetzung verringert das Vorkommen von Desorption oder Oberflächen-Wanderung des grenzflächenaktiven Mittels dramatisch. Beispielsweise lehren das Schmidt et al. erteilte US-Patent Nr. 4,929,666 und das Schmidt et al. erteilte US-Patent Nr. 5,006,624 das Adsorbieren von Copolymeren von Fluoral-  
kyl-Acrylaten bzw. Carboxyl-vinyl an Fluorkohlenstoff-Polymer-Oberflächen, gefolgt von Oberflächen-Vernetzung von adsorbierten Carboxyl-Baueinheiten, um eine gegen Oberflächen-Umorganisation oder gegen Desorption hochgradig stabile Beschichtung zu erzeugen. In einem anderen Beispiel wurde ein hydrophiles Fluorkohlenstoff-Polymer aus Tetrafluor-  
ethylen-co-vinylalkohol adsorbiert und chemisch unter Verwendung eines Polyether-bisoxiran-Vernetzers mit sich selbst vernetzt (Abaysekara erteiltes US-Patent Nr. 5,354,587). In einem anderen Beispiel wurde ein hydrophiles Kohlenwasserstoff-Polymer von Polyvinylalkohol adsorbiert und unter Verwendung eines Dialdehyd-Vernetzers mit sich selbst vernetzt (US-Patent Nr. 4,113,912 und Nr. 4,193,138, beide Okita erteilt). Dies führte dazu, dass die ePTFE-Oberfläche mit flüssigem Wasser benetzbar gemacht war und die adsorbierten Copolymer-Moleküle hochgradig beständig gegen Desorption oder gegen Oberflächen-Wanderung waren. Diese hydrophilen Oberflächen haben jedoch eine begrenzte oder stark verringerte Anzahl chemisch funktioneller Gruppen, an die zusätzliche Polymere oder bioaktive Spezies gebunden werden können. Wenn die adsorbierte Copolymer-Schicht einen Mangel an der gewünschten Anzahl oder Identität chemisch funktioneller Gruppen, die sie besitzt, hat, dann wird die Kapazität der Schicht aus adsorbiertem Copolymer oder grenzflächenaktivem Mittel, bioaktive Spezies zu immobilisieren, immer suboptimal bleiben. Dementsprechend ist diese Art von Vernetzung von adsorbierten Molekülen von grenzflächenaktivem

Mittel oder Copolymer an Kohlenwasserstoff- oder Fluorkohlenstoff-Polymer-Trägerbestandteile oft ungeeignet für die nachfolgende Immobilisierung bioaktiver Spezies.

5 Ein Trägerbestandteil, an den chemisch stabile und chemisch veränderliche hydrophile polymere Oberflächen gebunden sind, als ein Substrat, an das bioaktive Spezies stabil und effizient immobilisiert sind, wäre brauchbar. Eine solche Konstruktion würde einen Praktiker befähigen, die Anzahl und/oder Vielfalt immobilisierter bioaktiver Spezies zu erhöhen. Ein Praktiker wäre auch in der Lage, ein Konjugations-Schema zur Immobilisierung einer bioaktiven Spezies auszuwählen, das für die spezielle bioaktive Spezies am besten geeignet ist.

#### Zusammenfassung der Erfindung

15 Wie in dem Hintergrundabschnitt beschrieben, sind Verfahren des Stands der Technik für die Immobilisierung bioaktiver Spezies an Trägerbestandteilen, die aus Materialien auf Kohlenwasserstoff-Polymer- oder Fluorkohlenstoff-Polymer-Basis bestehen, problematisch. Die vorliegende Erfindung löst die oben beschriebenen Probleme mit einer Konstruktion, die chemische  
20 Veränderungen des Trägerbestandteils sowie die Notwendigkeit, vorsorgliche Maßnahmen zur Verringerung der Desorption der immobilisierten bioaktiven Spezies von dem Trägerbestandteil zu treffen, und die Notwendigkeit, die bioaktive Spezies vor der Immobilisierung mit grenzflächenaktiven Mitteln zu verändern, beseitigt. Die vorliegende Erfindung stellt einen  
25 Trägerbestandteil mit hydrophilen Oberflächen, an die bioaktive Spezies leicht immobilisiert werden, bereit. Die hydrophilen Oberflächen der Konstruktion sind chemisch stabil. Die Anzahl und Art der chemisch funktionellen Gruppen der hydrophilen Oberflächen können variiert werden. Die Fähigkeit, die chemisch funktionellen Gruppen der hydrophilen Oberflächen zu variieren, erlaubt einem Praktiker, die Anzahl und/oder Vielfalt chemisch funktioneller Gruppen, an die bioaktive Spezies immobilisiert werden können, zu erhöhen. Die vorliegende Erfindung erlaubt einem Praktiker auch,  
30



ein Konjugations-Schemat für die Immobilisierung bioaktiver Spezies auszuwählen, das die Bioaktivität und Stabilität der immobilisierten bioaktiven Spezies am besten aufrechterhält.

5 Bei der vorliegenden Erfindung schafft die Adsorption eines polymeren grenzflächenaktiven Mittels an einem Trägerbestandteil, gefolgt von Vernetzen von Ketten der Polymere des grenzflächenaktiven Mittels miteinander in situ, ein physikalisch und chemisch stabiles Substrat, oder eine erste Schicht, an die nachfolgend ein hydrophiles Polymer gebunden wird, wobei  
10 darauf eine zweite Schicht ausgebildet wird. Bevorzugt wird das hydrophile Polymer der zweiten Schicht kovalent an das vernetzte polymere grenzflächenaktive Mittel der ersten Schicht gebunden. Das hydrophile Polymer der gebundenen zweiten Schicht hat chemisch funktionelle Gruppen, über die bioaktive Spezies immobilisiert werden. Das hydrophile Polymer der zweiten Schicht wird so ausgewählt, dass es eine oder mehrere spezifische Arten chemisch funktioneller Gruppen zur Immobilisierung bioaktiver Spezies bereitstellt. Sobald eine bioaktive Spezies an der zweiten Schicht gebunden ist, ist das Ergebnis ein Trägerbestandteil mit hydrophilen Oberflächen, die physikalisch stabil und chemisch veränderbar sind, an die bioaktive Spezies  
15 stabil immobilisiert sind (siehe Fig. 1).  
20

Wenn es gewünscht wird, kann eine Mehrzahl von Schichten hydrophiler Polymere an die erste Schicht gebunden werden und an mindestens eine der Schichten bioaktive Spezies gebunden werden (siehe Fig. 2). Zusätzlich  
25 dazu, dass sie als ein Substrat für die Immobilisierung einer bioaktiven Spezies dienen, können zusätzliche Schichten hydrophiler Polymere dazu dienen, die hydrophilen Eigenschaften der Konstruktion zu erhöhen und/oder als eine durchlässige schützende Abdeckung für die bioaktive Spezies.

30 Alternativ können bioaktive Spezies direkt an chemisch funktionelle Gruppen der ersten Schicht immobilisiert werden, wie es in Fig. 3 veranschaulicht ist, oder an überschüssige chemisch funktionelle Gruppen des an die

erste Schicht gebundenen Vernetzungsmittels, wie es in Fig. 4 veranschaulicht ist.

Es wird auf Fig. 1 Bezug genommen: eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung (10) ist gerichtet auf ein Material mit immobilisierten bioaktiven Spezies, aufweisend einen Trägerbestandteil (12), eine erste Schicht (14), bestehend aus mindestens einer Art eines polymeren grenzflächenaktiven Mittels, das an den Trägerbestandteil gebunden und mit sich in situ vernetzt ist, eine zweite Schicht (18), bestehend aus mindestens einer Art eines hydrophilen Polymers, das an die erste Schicht gebunden ist, und mindestens eine Art einer bioaktiven Spezies (19), die an die zweite Schicht gebunden ist.

Die vorliegende Erfindung hat zwar viele Anwendungen, aber sie ist insbesondere geeignet für die Immobilisierung von Insulin absondernden Pankreas-Inselzellen oder genetisch veränderten Insulin absondernden Zellen. Die Immobilisierung derartiger Zellen kann nützlich sein zur Erleichterung der Transplantation und/oder Implantation der Zellen in einen Empfänger als ein Mittel zur Behandlung oder Besserung verschiedener Krankheiten, wie beispielsweise neuroendokriner Krankheiten, einschließlich Diabetes mellitus, neurologischer Krankheiten, einschließlich Parkinson-Krankheit, Stoffwechsel-Mangelkrankheiten, einschließlich Hurler-Krankheit. Die vorliegende Erfindung ist auch geeignet für die Immobilisierung von Nieren-Epithel- oder -Interstitialzellen zur Verwendung bei der Therapie von Nierenversagen. Von besonderem Interesse in dieser Hinsicht ist die Verwendung der vorliegenden Erfindung in der Form einer Membranbarriere für die Einkapselung von immobilisierten therapeutischen Zellen. Eine andere Verwendung der vorliegenden Erfindung ist für die Immobilisierung von Hepatozyten für die Konstruktion von extrakorporalen Leber-Unterstützungsvorrichtungen. Noch eine weitere Verwendung ist die Immobilisierung bioaktiver Spezies wie autogener Gefäß-Endothelzellen auf einem künstlichen Gefäßtransplantat oder auf einer polymerbeschichteten metallischen endoluminalen Gefäßprothese zur Verbesserung der Gefäßdurchgängigkeit. Weitere

Verwendungen beinhalten die Immobilisierung von antikoagulierenden Faktoren wie Heparin, Heparansulfat, tPA, Protein S, verschiedenen Lysin-Verbindungen, Urokinase, Protein C, etc. auf einem künstlichen Gefäßtransplantat oder auf einer polymerbeschichteten metallischen endoluminalen Gefäßprothese zur Verbesserung der Gefäß-Durchgängigkeit, die Immobilisierung von gerinnungsfördernden Faktoren wie Gewebefaktor, von Willebrand-Faktor, Faktor XIII, Kininogen, Thrombin, etc., die Immobilisierung von adhäsionsabhängigen oder adhäsionsunabhängigen Zelllinien, einschließlich genetisch veränderter Zellen zur Verwendung bei der Gentherapie, die Immobilisierung von adhäsionsabhängigen oder adhäsionsunabhängigen Zelllinien zur Verwendung bei der Transplantations-Therapie, die Immobilisierung von pro-adhäsiven Liganden wie dem Tripeptid Arg-Gly-Asp, Kollagenen und Fibronectin, beispielsweise, zur Förderung der Anhaftung zellulärer bioaktiver Spezies, die Immobilisierung anti-adhäsiver Liganden, wie Dextran, Albumin und Polyethylenglykol, beispielsweise, zur Verringerung unspezifischer zellulärer Anhaftung an Trägerbestandteile, und die Immobilisierung von Bakterien- oder Hefe-Zellen zur Verwendung bei Bioheilung und Biotechnologie.

Bei anderen Anwendungen können bei der vorliegenden Erfindung Enzyme, katalytische Antikörper oder Phasentransfer-Katalysatoren verwendet werden, um biokatalytische Reaktionen durchzuführen wie biosensitive und Enzymaffinitäts-Chromatographie. Außerdem können bei der vorliegenden Erfindung Proteine, Peptide, Kohlehydrate, Antikörper, Lektine oder Lipide verwendet werden, um Ligandenaffinitäts- oder Immunomatrix-Chromatographiesäulen zum Nachweis oder der Trennung von Produkten aus einem Flüssigkeitsstrom herzustellen. Eine weitere Verwendung der vorliegenden Erfindung ist als ein festes Substrat, auf dem die Synthese von Peptiden oder Arzneimitteln durchgeführt werden kann. Bei vielen dieser Verwendungen weist die vorliegende Erfindung eine permeable oder semipermeable Membranbarriere auf, die eine kontinuierliche Lösungsmittel-Phase durch die Barriere schafft, wie für den Transport von Gasen, Nährstoffen oder Reaktionsprodukten.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren, die Oberflächen eines hydrophoben Trägerbestandteils durch Erhöhen der Oberflächenenergie dieser Materialien hydrophiler zu machen, um das Benetzen und Verteilen von Fluiden hoher Oberflächenspannung darauf zu unterstützen. Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren zum stabilen Immobilisieren von bioaktiven Spezies an den auf dem Trägerbestandteil ausgebildeten hydrophilen Oberflächen.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1

veranschaulicht einen Querschnitt der vorliegenden Erfindung (10) mit einer ersten Schicht (14), die an einen Trägerbestandteil (12) gebunden ist, wobei der Buchstabe "x" angibt, dass die Bestandteile der ersten Schicht miteinander vernetzt sind, und das Symbol "x" (16) überschüssige chemisch funktionelle Gruppen des Vernetzungsmittels, woran eine zweite Schicht (18) gebunden ist, angibt. Der Buchstabe "B" (19) in Fig. 1 steht für eine bioaktive Spezies.

Fig. 2

veranschaulicht einen Querschnitt der vorliegenden Erfindung (10) mit einer zusätzlichen Schicht (26), hydrophiler Polymere, die an eine zweite Schicht (24) gebunden ist, wobei bioaktive Spezies (28) an der zusätzlichen Schicht (26) immobilisiert sind. Der Buchstabe "x" gibt an, dass die Bestandteile der ersten Schicht (22) miteinander vernetzt sind, und das Symbol "x" (23) gibt überschüssige chemisch funktionelle Gruppen des Vernetzungsmittels an, woran eine zweite Schicht (24) gebunden ist. Die zusätzliche Schicht hydrophiler Polymere wird so dargestellt, dass sie durch eine Mehrzahl vertikaler Linien an die

zweite Schichte gebunden ist. Der Buchstabe "B" (28) in Fig. 2 steht für eine bioaktive Spezies.

Fig. 3

veranschaulicht einen Querschnitt der vorliegenden Erfindung (30) mit einer ersten Schicht (34), die an einen Trägerbestandteil (32) gebunden ist, wobei bioaktive Spezies direkt an chemisch funktionelle Gruppen der ersten Schicht immobilisiert sind. Der Buchstabe "x" gibt an, dass die Bestandteile der ersten Schicht miteinander vernetzt sind. Der Buchstabe "B" in Fig. 3 steht für eine bioaktive Spezies (36).

Fig. 4

veranschaulicht einen Querschnitt der vorliegenden Erfindung (40) mit einer ersten Schicht (44), die an einen Trägerbestandteil (42) gebunden ist, wobei bioaktive Spezies (48) über überschüssige chemisch funktionelle Gruppen des Vernetzungsmittels an der ersten Schicht immobilisiert sind. Der Buchstabe "x" gibt an, dass die Bestandteile der ersten Schicht miteinander vernetzt sind. Das Symbol "x" (46) steht für überschüssige chemisch funktionelle Gruppen des Vernetzungsmittels. Der Buchstabe "B" (48) in Fig. 4 steht für eine bioaktive Spezies (48).

Fig. 5

ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Mikrostruktur eines Trägerbestandteils aus porösem Polytetrafluorethylen mit einer darauf immobilisierten bioaktiven Spezies.

Fig. 6

veranschaulicht einen Querschnitt der vorliegenden Erfindung (60) mit einer an einen Trägerbestandteil (62) gebundenen ersten Schicht (64), wobei die Bestandteile der ersten Schicht miteinander vernetzt sind und überschüssige chemisch funktionelle Gruppen des Vernetzungsmittels

vorhanden sind. Der Buchstabe "x" gibt an, dass die Bestandteile der ersten Schicht miteinander vernetzt sind. Das Symbol "x" (66) steht für überschüssige chemisch funktionelle Gruppen des Vernetzungsmittels.

Fig. 7

veranschaulicht einen Querschnitt der vorliegenden Erfindung (70), wobei eine erste Schicht (74) dergestalt an einen Trägerbestandteil (72) gebunden ist, dass die Anzahl chemisch funktioneller Gruppen, die zur Immobilisierung bioaktiver Spezies (71) verfügbar ist, von der ersten Schicht durch die Hinzufügung einer zweiten Schicht (78) erhöht wird. Der Buchstabe "x" gibt an, dass die Bestandteile der ersten Schicht miteinander vernetzt sind. Das Symbol "x" (76) steht für überschüssige chemisch funktionelle Gruppen des Vernetzungsmittels. Das Symbol "A" in dem die erste Schicht darstellenden Bereich gibt chemisch funktionelle Gruppen der Bestandteile der ersten Schicht an, die während der Bildung der ersten Schicht aufgebraucht wurden und nicht länger zur Immobilisierung bioaktiver Spezies verfügbar sind. Der Buchstabe "A" auf der zweiten Schicht steht für unumgesetzte chemisch funktionelle Gruppen der Bestandteile der zweiten Schicht, die zur Immobilisierung bioaktiver Spezies oder zur Bindung zusätzlicher Schichten hydrophiler Materialien an sie verfügbar sind. Der Buchstabe "B" (71) in Fig. 7 steht für eine bioaktive Spezies.

Fig. 8

veranschaulicht einen Querschnitt der vorliegenden Erfindung (80) mit einer ersten Schicht (84), die an einen Trägerbestandteil (82) gebunden ist, und einer zweiten Schicht (86), die an die erste Schicht gebunden ist, wobei eine Vielfalt chemisch funktioneller Gruppen durch die zweite Schicht bereitgestellt wird. Die chemisch funk-

nellen Gruppen der ersten Schicht werden durch den Buchstaben "A" dargestellt. Chemisch funktionelle Gruppen der zweiten Schicht können dieselben sein wie die chemisch funktionellen Gruppen der ersten Schicht, oder die Gruppen können verschieden sein. Die chemisch funktionellen Gruppen der zweiten Schicht werden durch den Buchstaben "Z" dargestellt. Der Buchstabe "B" in Fig. 8 steht für eine bioaktive Spezies.

5

10

Fig. 9

veranschaulicht eine Vorrichtung zur Zelleinkapselung, die eine gemäß der vorliegenden Erfindung aufgebaute Membran verwendet.

Fig. 10

15

ist eine Fotografie einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, bei der eine bioaktive Spezies in einem Muster auf porösem Polytetrafluorethylen immobilisiert ist.

Fig. 11

20

veranschaulicht einen Querschnitt der vorliegenden Erfindung (110) mit einer ersten Schicht (114), die an einen Trägerbestandteil (112) gebunden ist, und einer zweiten Schicht (116), die an die erste Schicht gebunden ist, wobei eine Abstandhalter-Verbindung (118) zwischen die zweite Schicht und eine bioaktive Spezies eingeschoben ist. Der Buchstabe "x" gibt an, dass die Bestandteile der ersten Schicht miteinander vernetzt sind. Das Symbol "x" (115) steht für überschüssige chemisch funktionelle Gruppen des Vernetzungsmittels. Der Buchstabe "B" (119) in Fig. 11 steht für eine bioaktive Spezies.

25

30

Fig. 12

veranschaulicht eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung in der Form eines Gefäßtransplantats.

Genaue Beschreibung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft polymere Materialien, hierin als Trägerbestandteile bezeichnet, mit einem daran gebundenen Substrat, bestehend aus Schichten chemisch stabiler und chemisch veränderbarer hydrophiler Polymere, an die bioaktive Spezies stabil immobilisiert sind. Gewünschtenfalls können metallische oder keramische Materialien bei der vorliegenden Erfindung als Trägerbestandteile verwendet werden.

Bei porösen Trägerbestandteilen erlaubt es die vorliegende Erfindung auch, dass bioaktive Spezies leicht an den Oberflächen immobilisiert werden, die die porösen Bereiche des Trägerbestandteils definieren, ohne die Porosität des Trägerbestandteils bemerkenswert zu verringern (siehe beispielsweise Fig. 5). Das Ergebnis ist ein Trägerbestandteil mit Oberflächen, die überall in seinem Volumen hydrophil und mit Fluiden hoher Oberflächenspannung benetzbar gemacht sind, woran mindestens eine Art von bioaktiver Spezies immobilisiert ist.

Bei der bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Konstruktion aus den folgenden Bestandteilen zusammengesetzt: einem Trägerbestandteil, bestehend aus einem polymeren Material, einer ersten Schicht, bestehend aus mindestens einer Art eines polymeren grenzflächenaktiven Mittels oder einem multifunktionellen Copolymer, bestehend aus mindestens einem Bereich, der physikalisch-chemische Affinität zu dem Trägerbestandteil hat, um physikalisch-chemische Adsorption des Polymers an der Oberfläche des Trägerbestandteils zu erlauben, und mindestens einem anderen Bereich, der chemisch reaktiv ist, um kovalente Vernetzung mit einem geeigneten Vernetzungsmittel zu erlauben, einem geeigneten Vernetzungsmittel, einer zweiten Schicht, die besteht aus einem oder mehreren hydrophilen grenzflächenaktiven Mitteln, Homopolymeren oder Copolymeren, die chemisch funktionelle Gruppen enthalten, die in der Lage sind, mit unverbrauchten freien vernetzenden Gruppen der ersten Schicht zu reagieren, und die zusätzliche Gruppen haben, um der Konstruktion eine erhöhte



Hydrophilie zu verleihen, und für eine nachfolgende Bindung von bioaktiven Spezies daran, und einer bioaktiven Spezies, die an die chemisch funktionellen Gruppen der zweiten Schicht gebunden sind.

5 Geeignete Materialien für einen hydrophoben polymeren Trägerbestandteil sind, aber ohne darauf beschränkt zu sein, Polytetrafluorethylen, expandiertes Polytetrafluorethylen, poröses Polytetrafluorethylen, fluoriertes Ethylenpropylen, Hexafluorpropylen, Polyethylen, Polypropylen, Nylon, Polyethylenterephthalat, Polyurethan, Silikonkautschuk, Polystyrol, Polysulfon, 10 Polyester, Polyhydroxysäuren, Polycarbonat, Polyimid, Polyamid, Polyaminosäuren, Regeneratzellulose oder Proteine wie Seide, Wolle und Leder. Expandiertes, oder poröses Polytetrafluorethylen (ePTFE) ist besonders bevorzugt. Verfahren zur Herstellung von porösen Polytetrafluorethylen-Materialien sind beschrieben in den US-Patenten 15 3,953,566 und 4,187,390, beide Gore erteilt, die beide durch Bezugnahme herein inkorporiert werden.

Obwohl die vorliegende Erfindung in erster Linie Konstruktionen betrifft, die mit Trägerbestandteilen hergestellt sind, welche hydrophob sind, können auch einige nicht hydrophobe Materialien zur Verwendung bei der vorlie- 20 genden Erfindung geeignet sind. Geeignete Materialien für hydrophile Trägerbestandteile sind, aber ohne darauf beschränkt zu sein, beispielsweise Zellulose-Derivate, Agarose, Alginat, Polyhydroxyethylmethacrylat, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol, Polyallylamin, Polyallylalkohol, Polyacrylamid und Polyacrylsäure. Schließlich können bestimmte Metalle und Kera- 25 miken geeignete Materialien zur Verwendung als Trägerbestandteile bei der vorliegenden Erfindung sein. Geeignete Metalle für Trägerbestandteile sind, aber ohne darauf beschränkt zu sein, beispielsweise Titan, rostfreier Stahl, Gold, Silber, Rhodium, Zink, Platin, Rubidium und Kupfer. Geeignete Materialien für keramische Trägerbestandteile sind, aber ohne darauf be- 30 schränkt zu sein, beispielsweise Siliciumoxide, Aluminiumoxide, Aluminiumoxid, Siliciumdioxid, Hydroxyapatite, Gläser, Calciumoxide, Polysilane und Phosphoroxide.

Zur Konstruktion der vorliegenden Erfindung wird eine erste Schicht auf einem Trägerbestandteil ausgebildet, indem ein polymeres grenzflächenaktives Mittel an den Oberflächen des Trägerbestandteils adsorbiert wird, gefolgt von Vernetzen des grenzflächenaktiven Mittels mit sich selbst in situ.

5 Bei einem porösen Trägerbestandteil wird die erste Schicht gewünschtenfalls auch an Material adsorbiert, das die porösen Hohlräume des Trägerbestandteils definiert. Beispielsweise wird eine Lösung, bestehend aus einem polymeren grenzflächenaktiven Mittel, das in einer Konzentration von etwa 0,001 % bis etwa 99,9 %, bevorzugt etwa 0,25 % bis etwa 5 % in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst ist, zu Anfang an den Oberflächen und

10 gewünschtenfalls in den porösen Räumen eines porösen Trägerbestandteils adsorbiert, einfach durch Eintauchen des Trägerbestandteils in die Lösung für etwa 0,05 Minuten bis etwa 20 Minuten, um Physisorption des grenzflächenaktiven Mittels an den Oberflächen des Trägerbestandteils zu erlauben.

15 Geeignete Materialien für die erste Schicht sind, aber ohne darauf beschränkt zu sein, Polyvinylalkohol, Polyethylenglykol, Polypropylenglykol, Dextran, Agarose, Alginat, Polyacrylamid, Polyglycidol, Poly(vinylalkohol-co-ethylen), Poly(ethylenglykol-co-propylenglykol), Poly(vinylacetat-co-vinylalkohol), Poly(tetrafluorethylen-co-vinylalkohol), Poly(acrylnitril-co-acrylamid), Poly(acrylnitril-co-acrylsäure-co-acrylamidin), Polyacrylsäure,

20 Polylysin, Polyethylenimin, Polyvinylpyrrolidon, Polyhydroxyethylmethacrylat und Polysulfon und ihre Copolymere, entweder alleine oder in Kombination. Bevorzugte Copolymere zur Ausbildung der ersten Schicht sind Copolymere, die bestehen aus mindestens einer Baueinheit, die in der Lage ist, physikalisch-chemisch an den Trägerbestandteil zu adsorbieren, einer Baueinheit, die zur chemischen Veränderung mit einem geeigneten Mittel in der Lage ist, und einer Baueinheit, die in der Lage ist, mit Fluiden hoher Oberflächenspannung zu wechselwirken. Diese Baueinheiten können so ausgewählt werden, dass eine Baueinheit alle diese drei Rollen gleichzeitig

25 erfüllt, zwei Rollen erfüllt oder nur eine Rolle erfüllt. Geeignete Lösungsmittel für diesen Zweck sind, aber ohne darauf beschränkt zu sein, Methanol, Ethanol, Isopropanol, Tetrahydrofuran, Trifluoressigsäure, Aceton,

30

Wasser, Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO), Acetonitril, Benzol, Hexan, Chloroform und überkritisches Kohlendioxid.

5 Wenn ein hydrophober Trägerbestandteil verwendet wird und das für die erste Schicht ausgewählte Polymer sich nur in Lösungsmitteln mit hoher Oberflächenspannung löst, sollte der hydrophobe Trägerbestandteil mit einem mischbaren Lösungsmittel mit einer niedrigen Oberflächenspannung vorbenetzt werden, um eine Adsorption des Polymers für die erste Schicht zu bewirken. Bei porösen Trägerbestandteilen kann ein Überschuss an adsorbiertem grenzflächenaktivem Mittel unter Verwendung von frischem Lösungsmittel von der Oberfläche gespült werden, um massig abgeschiedenes grenzflächenaktives Mittel daran zu hindern, Poren des Trägerbestandteils teilweise zu blockieren. Dieser Schritt ist zwar optional, aber bevorzugt, um sicherzustellen, dass die Poren eines porösen Trägerbestandteils wie ePTFE nicht mit grenzflächenaktivem Mittel verstopft werden.

10

15

Das polymere grenzflächenaktive Mittel der ersten Schicht wird unter Verwendung eines geeigneten Vernetzungsmittels in situ kovalent mit sich selbst vernetzt, um oberflächengebundene planare Moleküle mit extrem hohem Molekulargewicht zu erzeugen. Diese Moleküle mit sehr hohem Molekulargewicht dienen dazu, das Potential für Desorption oder Migration des grenzflächenaktiven Mittels stark zu verringern oder zu beseitigen. Geeignete Reagentien zur Verwendung beim Vernetzen des polymeren grenzflächenaktiven Mittels in situ sind Verbindungen, die bestehen aus mindestens zwei chemisch funktionellen Gruppen, entweder homofunktionell oder heterofunktionell, zu denen gehören, aber ohne darauf beschränkt zu sein, Aldehyde, Epoxide, Acylhalogenide, Alkylhalogenide, Isocyanate, Amine, Anhydride, Säuren, Alkohole, Halogenacetale, Arylcarbonate, Thiole, Ester, Imide, Vinyl, Azide, Nitro-Verbindungen, Peroxide, Sulfone und Maleimide, gelöst in Lösungsmitteln, die die adsorbierte Schicht benetzen. Zum Lösen des Vernetzungsmittels geeignete Lösungsmittel sind, aber ohne darauf beschränkt zu sein, Aceton, Wasser, Alkohole, Tetrahydrofuran (THF), Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylformamid (DMF), Benzol, Acetonitril

20

25

30

und Dioxan. Andere Reagentien sind, aber ohne darauf beschränkt zu sein, freie Radikale, Anionen, Kationen, Plasma-Bestrahlung, Elektronen-Bestrahlung und Photonen-Bestrahlung. Ein bevorzugtes Vernetzungsmittel ist Glutaraldehyd, bevorzugt unter Verwendung eines HCl-Katalysators, bevorzugt in Wasser gelöst.

Unabhängig davon, welches Vernetzungsmittel verwendet wird, wird das Vernetzungsmittel bevorzugt im Überschuss zugegeben, d.h. in einer solchen Menge, dass genügend unumgesetzte chemisch funktionelle Gruppen des Vernetzungsmittels vorhanden sein werden, um nach dem Vernetzungsschritt als Anbindungs-Punkte für die zweite Schicht zu dienen (siehe Fig. 6). So erfüllt das Vernetzungs-Schema zwei Rollen. Gemäß einer Rolle bildet das Vernetzen oberflächengebundene planare Moleküle von extrem hohem Molekulargewicht. Gemäß einer anderen Rolle schafft das Vernetzen chemisch funktionelle Gruppen, an die die zweite Schicht nachfolgend gebunden wird. Danach werden bioaktive Spezies an unumgesetzte chemisch funktionelle Gruppen des Vernetzungsmittels gebunden (siehe Fig. 4).

Bei einer alternativen Ausführungsform kann das polymere grenzflächenaktive Mittel der ersten Schicht mit Verfahren, die kein chemisches Vernetzungsmittel verwenden, an den Trägerbestandteil gebunden werden. Polymere grenzflächenaktive Mittel beispielsweise, die zahlreiche Nitril-Gruppen enthalten, können sich spontan selbst zu einer stabilen Konformations-Beschichtung zusammenfügen, wenn sie an dem Trägerbestandteil adsorbiert werden. Die Stabilität der Beschichtung stammt vom physikalischen Vernetzen benachbarter Polymerketten über polare Cyano-Wechselwirkungen. Bei einem anderen Beispiel kann das polymere grenzflächenaktive Mittel unter Verwendung eines geeigneten Mittels via Säure-Base-Koazervation physikalisch vernetzt werden, z.B. kann eine erste Schicht, die aus einem kationischen polymeren grenzflächenaktiven Mittel gebildet ist, durch die Anwendung eines anionischen Mittels physikalisch vernetzt werden. Außerdem kann ein amphoterer polymerer grenzflächenaktiver Mittel sich via interner Säure-Base-Koazervation spontan zu einer Konformations-

Beschichtung zusammenfügen. Bei noch einem weiteren Beispiel lehrt die Minnesota Mining and Manufacturing Company in PCT/US91/07686 die Anwendung einer hydrophilen Polyvinylalkohol-Schicht, die via Interketten- und Intraketten-Polymerkristallisierung nicht-kovalent vernetzt wird.

5

Der Grad der Vernetzung der ersten Schicht kann durch Fourier Transform Infrarot Spektroskopie (FTIR) beurteilt werden. Beispielsweise sind mit FTIR die freien Hydroxyl-Gruppen von Polyvinylalkohol (PVA) vor dem Vernetzen bei etwa  $3349\text{ cm}^{-1}$  nachweisbar. Nach dem Vernetzen verschiebt sich der Peak zu etwa  $3383\text{ cm}^{-1}$  und verliert an Höhe. Als eine positive interne Kontrolle, ein FTIR-Peak bei näherungsweise  $2942\text{ cm}^{-1}$  aufgrund von  $\text{CH}_2$ -Gruppen verändert als ein Ergebnis der Vernetzung die Position oder Höhe nicht. Ein Verschieben der Peak-Position der Hydroxyl-Gruppe (OH) von etwa  $3349\text{ cm}^{-1}$  zu etwa  $3383\text{ cm}^{-1}$  unter Verringerung der Peak-Höhe ist ein Anzeichen für die Menge an PVA, die bei der Bildung der ersten Schicht vernetzt wurde.

15

Das Ausmaß, in dem freie oder überschüssige Aldehyd-Gruppen eines Vernetzungsmittels, wie Glutaraldehyd, nach dem Vernetzungsschritt in der ersten Schicht vorhanden sind, kann auch unter Verwendung von FTIR bestimmt werden. Wenn beispielsweise ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung mit einer ersten Schicht aus PVA, die mit Glutaraldehyd umfangreich vernetzt ist, dampfsterilisiert wird, hat der Gegenstand üblicherweise FTIR-Peaks bei etwa  $1590\text{ cm}^{-1}$  und etwa  $1690\text{ cm}^{-1}$ . Von diesen Peaks wird angenommen, dass sie überschüssige Aldehyd-Gruppen der ersten Schicht und ihre Produkte partieller Hydrolyse durch die Dampf-Exposition darstellen. Ein ähnlicher Gegenstand mit einer ersten Schicht, die kurz einem Glutaraldehyd-Vernetzungsmittel ausgesetzt wird, hat üblicherweise keinen FTIR-Peak bei  $1590\text{ cm}^{-1}$ . Dementsprechend kann das Ausmaß, in dem eine erste Schicht überschüssige chemisch funktionelle Gruppen enthält, durch Vergleichen des Verhältnisses eines FTIR-Peaks bei etwa  $1690\text{ cm}^{-1}$  zu einem FTIR-Peak bei etwa  $1590\text{ cm}^{-1}$  beurteilt werden.

20

25

30

FTIR kann auch verwendet werden, um die Anwesenheit einer zweiten Schicht, die an eine erste, mit Glutaraldehyd vernetzte Schicht gebunden ist, nachzuweisen. Beispielsweise wird ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung mit einer zweiten Schicht aus PVA, die an eine erste Schicht aus PVA gebunden ist, starke FTIR-Peaks bei etwa  $2950\text{ cm}^{-1}$  und bei etwa  $3350\text{ cm}^{-1}$  haben. Diese Peaks stellen Signale von dem Kohlenwasserstoff-Rückgrat bzw. den freien Hydroxyl-Gruppen des PVA, sowohl von der ersten als auch der zweiten Schicht, dar. Das Fehlen eines FTIR-Peaks bei etwa  $1590\text{ cm}^{-1}$  und etwa  $1690\text{ cm}^{-1}$  ist ein Hinweis, dass im Wesentlichen alle Aldehyd-Gruppen des Glutaraldehyd-Vernetzungsmittels während des Bindens der zweiten Schicht an die überschüssigen Aldehyd-Gruppen der ersten Schicht verbraucht wurden.

Außerdem kann eine erste oder zweite Schicht aus Poly(lysin) auf einem Trägerbestandteil durch röntgenstrahlenangeregte Fotoelektronenspektroskopie (XPS) nachgewiesen werden. Beispielsweise kann das Hinzufügen von Amino-Gruppen ( $\text{NH}_2$ ) an die Oberfläche durch die Messung von Stickstoff nachgewiesen werden. Stickstoff ist üblicherweise weder in Kohlenwasserstoff- noch für Fluorkohlenstoff-Trägerbestandteilen der vorliegenden Erfindung anwesend. Gleichermaßen kann beispielsweise die Immobilisierung von Zell-Anheft-Peptiden wie der Arg-Gly-Asp-Aminosäuresequenz an einer ersten oder zweiten Schicht aus PVA mittels XPS nachgewiesen werden.

Im Falle einer dreidimensionalen Vorrichtung wie einem Schaum oder Schwamm wird die Anwesenheit einer hydrophilen Schicht, die direkt an einen Trägerbestandteil gebunden ist oder eine erste oder zweite Schicht bildet, bevorzugt durch Elementaranalyse nachgewiesen.

Die Zusammensetzung der zweiten Schicht wird ausgewählt sowohl hinsichtlich der Fähigkeit der zweiten Schicht, mit der ersten Schicht zusammenzuwirken, um das Benetzen des hydrophoben Trägerbestandteils mit Fluiden hoher Oberflächenspannung zu fördern, als auch hinsichtlich ihrer

Fähigkeit, eine Anzahl und Vielfalt von üblicherweise an der ersten Schicht nicht vorhandenen chemisch funktionellen Gruppen, an denen bioaktive Spezies immobilisiert werden können, bereitzustellen.

5 Bei der Bildung der zweiten Schicht können verschiedene hydrophile Polymere zur Verwendung bei der Herstellung der Schicht ausgewählt werden. Verschiedene hydrophile Polymere liefern eine Vielfalt chemisch funktioneller Gruppen, aus denen beim Binden von bioaktiven Spezies an die zweite Schicht auszuwählen ist (siehe Fig. 7). Als ein Ergebnis gibt die zweite  
10 Schicht die Art chemisch funktioneller Gruppen, an denen bioaktive Spezies immobilisiert werden, vor. Außerdem vergrößert die Bindung einer zweiten Schicht an die unverbrauchten Baueinheiten des Vernetzungsmittels die Anzahl chemisch funktioneller Gruppen, die für die Immobilisierung bioaktiver Spezies zur Verfügung stehen, auf Zahlen, die viel größer sind, als sie bei  
15 Verwendung nur der ersten Materialschicht an dem Trägerbestandteil möglich sind. Dies ist ein Schlüsselmerkmal der vorliegenden Erfindung, weil die Fähigkeit, die Art und die Anzahl chemisch funktioneller Gruppen, die zur Immobilisierung bioaktiver Spezies verwendet werden, die von der zweiten Schicht bereitgestellt werden, auszuwählen, mit der ersten Schicht  
20 alleine nicht leicht erhalten wird.

Eine zweite Schicht wird an der ersten Schicht ausgebildet durch Binden eines hydrophilen Polymers an das vernetzte polymere grenzflächenaktive Mittel der ersten Schicht mittels der unumgesetzten chemisch funktionellen  
25 Gruppen des Vernetzungsmittels (siehe Fig. 1). Bevorzugt werden die hydrophilen Polymere kovalent an die polymeren grenzflächenaktiven Mittel gebunden. Bei einem Verfahren wird die zweite Schicht an die erste Schicht gebunden durch Eintauchen eines Trägerbestandteils mit einer adsorbierten und vernetzten ersten Schicht in eine Lösung eines hydrophilen Polymers  
30 der zweiten Schicht mit einer Konzentration von etwa 0,001 % bis etwa 99,9 %, bevorzugt etwa 0,1 % bis etwa 50 %, bevorzugter etwa 1,0 % bis etwa 25 %, und am meisten bevorzugt etwa 0,25 % bis etwa 5 %. Die Lösung des hydrophilen Polymers beinhaltet einen geeigneten Katalysator wie organi-

sche Säuren oder Basen, Mineral-Säuren oder -Basen, Lewis-Säuren oder -Basen, metallorganische Katalysatoren, organische und/oder anorganische Salze, Wärme, Druck, Elektronen-Bestrahlung, Photonen-Bestrahlung, Plasma-Bestrahlung, Koronaentladung oder pH, um die Bindung der chemisch funktionellen Gruppen an die erste Schicht zu bewirken.

Geeignete hydrophile Polymere zur Verwendung bei der Ausbildung der zweiten Schicht sind, aber ohne darauf beschränkt zu sein, Polyvinylalkohol, Polylysin, Poly(acrylnitril-co-acrylsäure-acrylamid), Polyacrylsäure, Polyhydroxyethylmethacrylat, Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenglykol, Alginat, Sepharose, Mercaptosilan, Aminosilan, Hydroxylsilan, Agarose, Polyethylenimin, Polyallylamin, Polyaminoethylmethacrylat, Polyornithin, Polyaminoacrylamid, Polyacrylamid, Polyacrolein, Polyacryloxysuccinimid, Polysulfon, Poly(acrylnitril-co-acrylamid) oder ihre Copolymere, entweder allein oder in Kombination. Polyvinylalkohol ist bevorzugt. Geeignete Lösungsmittel zum Lösen der hydrophilen Polymere sind, aber ohne darauf beschränkt zu sein, Wasser, Alkohole, Dioxan, Dimethylformamid, Tetrahydrofuran und Acetonitril, etc.

Sobald eine zweite Schicht auf der ersten Schicht ausgebildet ist, werden dann bioaktive Spezies an der zweiten Schicht immobilisiert unter Verwendung milder Biokonjugations-Techniken, wie sie Fachleuten bekannt sind (siehe K. Mosbach, Immobilized Enzymes and Cells, Part B, Academic Press (Orlando, FL), (1987); G. T. Hermanson, A. K. Mallia, P. K. Smith, "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, San Diego, (1992); S. F. Karel, S. B. Libicki, C. R. Robertson, "The Immobilization of Whole Cells: Engineering Principles", Chemical Eng. Sci., 40: 1321 (1985); und M. Brinkley, "A Brief Survey Of Methods For Preparing Protein Conjugates With Dyes, Haptens, and Cross-Linking Reagents", Bioconjugate Chem., 3:2 (1992), beispielsweise). Für die Immobilisierung bioaktiver Spezies werden milde Biokonjugations-Schemata bevorzugt, um eine Beschädigung der Struktur des Trägerbestandteils, des polymeren grenzflächenakti-



ven Mittels der ersten Schicht, des hydrophilen Polymers der zweiten Schicht und der bioaktiven Spezies auszuschließen oder zu minimieren.

5 Es wird auf Fig. 8 Bezug genommen: die chemisch funktionellen Gruppen der ersten Schicht sind, aber ohne darauf beschränkt zu sein, Hydroxyl-Gruppen, Carboxyl-Gruppen, Säureanhydrid-Gruppen, Acylhalogenid-Gruppen, Alkylhalogenid-Gruppen, Aldehyd-Gruppen, Alken-Gruppen, Amid-Gruppen, Amin-Gruppen, Guanidin-Gruppen, Malimid-Gruppen, Thiol-Gruppen, Sulfonat-Gruppen, Sulfonylhalogenid-Gruppen, Sulfonylester-Gruppen, Carbodiimid-Gruppen, Ester-Gruppen, Cyano-Gruppen, Epoxid-Gruppen, Prolin-Gruppen, Disulfid-Gruppen, Imidazol-Gruppen, Imid-Gruppen, Imin-Gruppen, Isocyanat-Gruppen, Isothiocyanat-Gruppen, Nitro-Gruppen und Azid-Gruppen. Die chemisch funktionellen Gruppen der ersten Schicht sind in Fig. 8 als der Buchstabe "A" dargestellt. Die chemisch funktionellen Gruppen der zweiten Schicht sind, aber ohne darauf beschränkt zu sein, irgendeine der für die erste Schicht aufgelisteten Gruppen und/oder Hydroxyl-Gruppen, Carboxyl-Gruppen, Säureanhydrid-Gruppen, Acylhalogenid-Gruppen, Alkylhalogenid-Gruppen, Aldehyd-Gruppen, Alken-Gruppen, Amid-Gruppen, Amin-Gruppen, Guanidin-Gruppen, Malimid-Gruppen, Thiol-Gruppen, Sulfonat-Gruppen, Sulfonylhalogenid-Gruppen, Sulfonylester-Gruppen, Carbodiimid-Gruppen, Ester-Gruppen, Cyano-Gruppen, Epoxid-Gruppen, Prolin-Gruppen, Disulfid-Gruppen, Imidazol-Gruppen, Imid-Gruppen, Imin-Gruppen, Isocyanat-Gruppen, Isothiocyanat-Gruppen, Nitro-Gruppen und Azid-Gruppen. Die chemisch funktionellen Gruppen der zweiten Schicht sind in Fig. 8 durch den Buchstaben "Z" dargestellt.

30 Zusätzlich zur Schaffung von Variierbarkeit in der Anzahl und Identität chemisch funktioneller Gruppen, die zur Immobilisierung bioaktiver Spezies verwendet werden können, kann die Variierbarkeit in der Anzahl und Identität der funktionellen Gruppen der zweiten Schicht verwendet werden, um die Benetzbarkeit des Trägerbestandteils mit Fluiden hoher Oberflächenspannung zu erhöhen. Bei einer Ausführungsform wird ein poröser hydrophober Trägerbestandteil nur an seiner Oberfläche durch eine dünne erste

5 und zweite Schicht modifiziert, wobei das die porösen Hohlräume des Trägerbestandteils definierende Material unmodifiziert und hydrophob belassen wird. Bei einer anderen Ausführungsform können die erste und zweite Schicht auch auf dem Material ausgebildet werden, das die inneren porösen Hohlräume des porösen Trägerbestandteils definiert, und bioaktive Spezies darauf immobilisiert werden. Bei dieser Ausführungsform kann leicht eine kontinuierliche Wasserphase durch die Poren des Trägerbestandteils eingestellt und aufrechterhalten werden, was zu einem guten Transport von beispielsweise Reaktionsprodukten oder Nährstoffen durch den porösen Trägerbestandteil führt. Dünne Beschichtungen sind für poröse Trägerbestandteile besonders bevorzugt, weil dünne Beschichtungen die Porosität des Trägerbestandteils nicht bemerkenswert verringern. Für unmodifiziertes poröses PTFE mit einer nominellen Dicke von etwa 40 Mikron, einer nominellen Porengröße von etwa 0,2 Mikron und einer nominellen Porosität von etwa 70 % liegt die Permeabilität des Materials für Luft in Gurley-Sekunden zwischen etwa 22 Sekunden und etwa 24 Sekunden. Ein gemäß der vorliegenden Erfindung modifiziertes poröses PTFE-Material hat eine Permeabilität für Luft von etwa 24 Gurley-Sekunden bis etwa 26 Gurley-Sekunden.

20 Unter manchen Umständen kann die Wechselwirkung eines Reaktionsmittels in Lösungs-Phase mit einer immobilisierten bioaktiven Spezies suboptimal sein. Beispielsweise kann sterische Hinderung zwischen der ersten oder zweiten Schicht und der immobilisierten bioaktiven Spezies die Annäherung des Reaktionsmittels in gelöster Phase an die bioaktive Spezies beschränken. Außerdem können auch physikalische Masse, elektrostatische Abstoßung oder ungeeignete Anordnung der bioaktiven Spezies zu einer verringerten Effizienz der immobilisierten bioaktiven Spezies beitragen. Folglich kann es wünschenswert sein, eine oder mehrere zusätzliche Verbindungen als einen "Abstandhalter" oder "Anbinder" zwischen den chemisch funktionellen Gruppen der ersten oder zweiten Schicht und der bioaktiven Spezies anzuordnen, um den Raum zwischen der Schicht und der bioaktiven Spezies zu vergrößern. Geeignete Verbindungen zur Verwendung als ein Abstandhalter sind, aber ohne darauf beschränkt zu sein, beispiels-

weise Succinsäure, Diaminohexan, Glyoxylsäure, kurzkettiges Polyethylenglykol und Glycin. Es versteht sich, dass die zweite Schicht selbst als ein Abstandhalter-Arm dienen kann, ohne die Verwendung einer separaten Abstandhalter-Verbindung zu erfordern.

5

Die kovalente Immobilisierung von Biospezies an Trägerbestandteilen gemäß der vorliegenden Erfindung ist im Allgemeinen nicht reversibel, d.h. die Biospezies wird nicht leicht von der ersten oder zweiten Schicht des Trägerbestandteils freigesetzt. Abstandhalter oder Anbinder, die zur selektiven Freisetzung einer immobilisierten Biospezies fähig sind, sind brauchbar bei Rezeptor/Liganden-Wechselwirkungen, molekularer Identifizierung und Charakterisierung von Antikörper/Antigen-Komplexen und selektiver Reinigung von Zell-Unterpopulationen, etc. Außerdem gewährleistet ein selektiv abspaltbarer Abstandhalter eine vorhersagbare und kontrollierte Freisetzung von Biospezies von dem Trägerbestandteil, im Gegensatz zu der instabilen Physisorption von Biospezies, die in dem obigen Hintergrund-Abschnitt diskutiert wurde.

10

15

20

25

30

Selektive Freisetzung der Biospezies wird durchgeführt durch Spalten der Abstandhalter-Verbindung unter geeigneten Reaktionsbedingungen, wozu beispielsweise, ohne darauf beschränkt zu sein, Photonen-Bestrahlung, enzymatischer Abbau, Oxidation/Reduktion oder Hydrolyse gehören. Die selektive Abspaltung und Freisetzung immobilisierter Biospezies kann erreicht werden unter Verwendung von Techniken, die Fachleuten bekannt sind (siehe beispielsweise H. R. Horton & H. E. Swaisgood, "Covalent immobilization of proteins by techniques which permit subsequent release", Meth. Enzymology, 135: 130 (1987); S. S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991); und das Churchill et al. erteilte US-Patent Nr. 4,745,160, das durch Bezugnahme hierin aufgenommen wird). Geeignete Verbindungen zur Verwendung als abspaltbare Anbinder oder abspaltbare Abstandhalter-Verbindungen sind beispielsweise, aber ohne darauf beschränkt zu sein, Polyhydroxysäuren, Polyanhydride, Polyamino-säuren, Tartrate und Cystein-Linker wie Lomant Reagens.

Die vorliegende Erfindung ist nicht beschränkt auf die oben beschriebenen Ausführungsformen mit einer ersten Schicht und einer zweiten Schicht. Bei anderen Ausführungsformen können zusätzliche Schichten hydrophiler Polymere an bestehende Schichten auf dem Trägerbestandteil gebunden werden, um Konstruktionen mit Vielfach-Schichten von daran gebundenem hydrophilem Material zu bilden.

Ohne die Absicht, den Umfang der vorliegenden Erfindung zu beschränken, veranschaulichen die folgenden Beispiele, wie die vorliegende Erfindung hergestellt und verwendet werden kann.

#### Beispiele

##### Beispiel 1

Dieses Beispiel veranschaulicht ein Verfahren zur Herstellung einer ersten Schicht, die aus polymeren grenzflächenaktiven Mitteln besteht, auf einem Trägerbestandteil aus expandiertem Polytetrafluorethylen durch Adsorption und Vernetzen des polymeren grenzflächenaktiven Mittels an den Außenoberflächen eines Films aus expandiertem Polytetrafluorethylen sowie den Oberflächen, die die porösen Bereiche des Films beschreiben. Das Verfahren ist wie folgt.

Ein ePTFE-Trägerbestandteil in der Form eines Films (W. L. Gore & Associates, Inc.) mit einer Dicke von etwa 50 µm und einer Porosität, gemessen in Gurley-Sekunden, von etwa 22 bis 24, wurde in eine 1,5 %-ige Lösung eines statistischen Copolymers von Tetrafluorethylen und Vinylalkohol (hierin im folgenden HPL-1, Japan Gore, Inc.) in Methanol (Gewicht/Volumen) etwa 5 Minuten lang eingetaucht. Diese Film-Konstruktion wurde dann etwa 5 Minuten lang in Methanol eingetaucht, um nicht adsorbiertes, loses Copolymer von der ePTFE-Oberfläche abzuspielen. Der ePTFE-

Trägerbestandteil mit der HPL-1-Schicht wurde dann durch etwa 5-minütiges Eintauchen in destilliertes Wasser von Methanol freigewaschen.

5 Die adsorbierte HPL-1-Schicht wurde in situ auf dem ePTFE-Trägerbestandteil vernetzt durch etwa 5-minütiges Tauchen der Film-Konstruktion in eine wässrige Lösung von etwa 5 % Glutaraldehyd und etwa 1 % HCl als Katalysator bei etwa 70°C, um die Vinylalkohol-Gruppen der adsorbierten HPL-1-Copolymerketten via Acetalisierung zu vernetzen. Diese Film-Konstruktion wurde in Wasser gespült, um überschüssigen Glutaraldehyd und HCl zu entfernen. Die sich ergebende Film-Konstruktion war ein ePTFE-Trägerbestandteil mit einer darauf ausgebildeten ersten Schicht.

#### Beispiel 2

15 Dieses Beispiel veranschaulicht die Stabilität der ersten Schicht der im Beispiel 1 beschriebenen Film-Konstruktion. Die Stabilität einer bestimmten Schicht wird ausgedrückt als Hydrophilie der Oberfläche der Film-Konstruktion. Wie oben erwähnt, ist eine hydrophile Oberfläche eine Oberfläche, die mit Fluiden hoher Oberflächenspannung leicht benetzt wird. Um die Hydrophilie einer Oberfläche mit einer anderen Oberfläche zu vergleichen, wird ein Wassertropfen auf die Testoberfläche gebracht und sein Verhalten beobachtet. Wenn sich der Wassertropfen auf der Oberfläche des Materials ausbreitete, um die Poren des Materials zu benetzen und mit Wasser zu füllen und das Material transparent zu machen, wurde die Oberfläche des Materials als hydrophil betrachtet. Wenn sich der Wassertropfen nicht auf der Oberfläche des Materials ausbreitete oder die Poren benetzte, um sie im Wesentlichen vollständig mit Wasser zu füllen, sondern sich auf der Oberfläche des Materials nach oben rundete, was das Material durchscheinend oder opak machte, wurde die Oberfläche des Materials als hydrophob betrachtet.

30 Um die Stabilität der ersten Schicht der Film-Konstruktion zu testen, wurden zwei Film-Konstruktionen verwendet. Eine erste Film-Konstruktion

5 wurde hergestellt, wie es in Beispiel 1 beschrieben ist. Eine zweite Film-Konstruktion wurde ähnlich zu der Film-Konstruktion von Beispiel 1 hergestellt, aber ohne den Vernetzungsschritt. Beide Konstruktionen wurden etwa 24 Stunden lang in verschiedene am Rückfluss siedende Lösungsmittel wie Wasser, Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO) und Aceton eingetaucht. Die Film-Konstruktionen wurden dann aus dem Lösungsmittel entfernt, mit frischem Lösungsmittel gespült und luftgetrocknet. Die Hydrophilie der bestimmten Oberfläche wurde dann durch Aufbringen eines oder 10 mehrerer Tropfen deionisierten Wassers auf die Oberfläche getestet. Die zweite Film-Konstruktion zeigte ein signifikantes Absinken der Hydrophilie der Oberflächen der Konstruktion. Die verringerte Hydrophilie wurde in erster Linie einer Desorption des Copolymers von der Oberfläche der Konstruktionen und einer Copolymer-Kettenmigration an der Oberfläche der Konstruktionen zugeschrieben. Die Film-Konstruktion von Beispiel 1, d.h. 15 mit Vernetzung, blieb unter denselben Bedingungen hydrophil.

Bei einem anderen Stabilitätstest wurden die erste und die zweite Film-Konstruktion jeweils zehnmal bei etwa 120°C für etwa 15 Minuten unter Dampf im Autoklaven behandelt und dann in deionisiertes Wasser getaucht. 20 Wenn die zweite Film-Konstruktion in deionisiertes Wasser getaucht wurde, wurde die Konstruktion als hydrophob betrachtet. Im Gegensatz dazu wurde die erste Film-Konstruktion spontan bis zur Vollständigkeit mit dem deionisierten Wasser benetzt und wurde daher als hydrophil betrachtet. Es wird davon ausgegangen, dass diese Ergebnisse Oberflächen-Instabilität und Zusammenlagerung an der Oberfläche der zweiten Film-Konstruktion anzeigen, was zu einer Verringerung der Benetzungsfähigkeit führt. Andererseits zeigte die erste Film-Konstruktion, bei der die erste Schicht vernetzt war, Stabilität grenzflächenaktiver Mittel. 25

## Beispiel 3

Dieses Beispiel veranschaulicht die Verwendung eines anderen Reagens zur Vernetzung des polymeren grenzflächenaktiven Mittels von Beispiel 1. Das  
5 Verfahren ist wie folgt.

Nach der Adsorption des grenzflächenaktiven Mittels an die Oberflächen des ePTFE-Trägerbestandteils in Beispiel 1 wurde die Film-Konstruktion etwa 30 Minuten lang bei etwa 75°C in eine wässrige Lösung von etwa 2 %  
10 Polyethylenglykol-dialdehyd (3400 g/Mol, Shearwater Polymers) mit etwa 0,1 % HCl als Katalysator eingetaucht, um die Vinylalkohol-Gruppen der adsorbierten HPL-1-Copolymerketten via Acetalisierung zu vernetzen. Diese Film-Konstruktion wurde in Wasser gespült, um überschüssigen Polyethylenglykol-dialdehyd und HCl zu entfernen. Die sich ergebende Film-  
15 Konstruktion war ein ePTFE-Trägerbestandteil mit einer darauf ausgebildeten ersten Schicht.

## Beispiel 4

Dieses Beispiel veranschaulicht die Verwendung eines anderen Reagens zur Vernetzung des polymeren grenzflächenaktiven Mittels von Beispiel 1. Dieses Verfahren ist aus dem Abaysekara erteilten US-Patent Nr. 5,354,587 unter Anpassung übernommen und wird wie folgt durchgeführt.

Nach der Adsorption des grenzflächenaktiven Mittels an die Oberflächen des ePTFE-Trägerbestandteils in Beispiel 1 wurde die Film-Konstruktion etwa 30 Sekunden lang in eine methanolische Lösung von etwa 0,25 % Kaliumhydroxid (KOH) eingetaucht, gefolgt von Lufttrocknung. Die Film-Konstruktion wurde dann etwa 5 Minuten lang in eine Aceton-Lösung von  
25 etwa 10 % Polyethylenglykol-diglycidylether (400 g/Mol, Polysciences) eingetaucht. Die Film-Konstruktion wurde etwa 3 Stunden lang bei etwa 75°C im Vakuum gehärtet, um die Vinylalkohol-Gruppen der adsorbierten HPL-1-Copolymerketten via Epoxid-Alkoholyse zu vernetzen. Die Film-  
30

Konstruktion wurde in destilliertem Wasser gespült, um überschüssigen Polyethylenglykol-diglycidylether und KOH zu entfernen. Die sich ergebende Film-Konstruktion war ein ePTFE-Trägerbestandteil mit einer darauf ausgebildeten ersten Schicht.

#### Beispiel 5

Dieses Beispiel veranschaulicht die Stabilität der ersten Schicht der in Beispiel 4 beschriebenen Film-Konstruktion. Die Stabilität einer bestimmten Schicht wird ausgedrückt als Hydrophilie der Oberfläche der Film-Konstruktion. Wie oben angegeben, ist eine hydrophile Oberfläche eine Oberfläche, die leicht mit Fluiden hoher Oberflächenspannung benetzt wird. Zum Vergleich der Hydrophilie einer Oberfläche mit einer anderen Oberfläche wird ein Wassertropfen auf die Testoberfläche gegeben und sein Verhalten beobachtet. Wenn sich der Wassertropfen auf der Oberfläche des Materials ausbreitete, um die Poren des Materials zu benetzen und mit Wasser zu füllen und das Material transparent zu machen, wurde die Oberfläche des Materials als hydrophil betrachtet. Wenn sich der Wassertropfen nicht auf der Oberfläche des Materials ausbreitete oder die Poren benetzte, um sie im Wesentlichen vollständig mit Wasser zu füllen, sondern sich auf der Oberfläche nach oben rundete und das Material durchscheinend oder opak machte, wurde die Oberfläche des Materials als hydrophob betrachtet.

Um die Stabilität der ersten Schicht der Film-Konstruktion zu testen, wurden zwei Film-Konstruktionen verwendet. Eine erste Film-Konstruktion wurde hergestellt, wie es in Beispiel 4 beschrieben ist. Eine zweite Film-Konstruktion wurde ähnlich der Film-Konstruktion von Beispiel 4 hergestellt, aber ohne den Vernetzungsschritt. Beide Konstruktionen wurden etwa 24 Stunden lang in verschiedene am Rückfluss siedende Lösungsmittel wie Wasser, Dimethylformamid (DMF) eingetaucht. Die Film-Konstruktionen wurden dann aus dem Lösungsmittel entfernt, in frischem Lösungsmittel gespült und luftgetrocknet. Die Hydrophilie der bestimmten Oberfläche wurde dann getestet, indem ein oder mehrere Tropfen deionisierten Wassers auf



auf die Oberfläche aufgebracht wurden. Die zweite Film-Konstruktion zeigte eine signifikante Verringerung der Hydrophilie der Oberflächen der Film-Konstruktion. Die verringerte Hydrophilie wurde in erster Linie einer Desorption des Copolymers von der Oberfläche der Konstruktionen und einer Copolymerketten-Wanderung an der Oberfläche der Konstruktionen zugeschrieben. Die erste Film-Konstruktion, d.h. mit Vernetzung, blieb unter denselben Bedingungen hydrophil.

Bei einem anderen Stabilitätstest wurden die erste und die zweite Film-Konstruktion bei etwa 120°C für etwa 20 Minuten unter Dampf im Autoklaven behandelt, luftgetrocknet und dann in deionisiertes Wasser eingetaucht. Wenn die zweite Film-Konstruktion in deionisiertes Wasser eingetaucht wurde, wurde die Film-Konstruktion als hydrophob betrachtet. Im Gegensatz dazu wurde die erste Film-Konstruktion spontan mit dem deionisierten Wasser bis zur Vollständigkeit benetzt und wurde so als hydrophil betrachtet. Man geht davon aus, dass diese Ergebnisse Oberflächen-Instabilität und Zusammenlagerung an den Oberflächen der zweiten Film-Konstruktion anzeigen, was zu einer Verringerung der Benetzungsfähigkeit führt. Andererseits zeigte die erste Film-Konstruktion Stabilität des grenzflächenaktiven Mittels.

#### Beispiel 6

Dieses Beispiel veranschaulicht ein Verfahren zur Herstellung einer ersten Schicht bestehend aus polymeren grenzflächenaktiven Mitteln auf einem Trägerbestandteil aus expandiertem Polytetrafluorethylen durch Adsorption und Vernetzen des polymeren grenzflächenaktiven Mittels an den Außenoberflächen eines Films aus expandiertem Polytetrafluorethylen sowie den Oberflächen, die die porösen Bereiche des Films darstellen. Das Verfahren ist wie folgt.

Ein ePTFE-Trägerbestandteil in der Form eines Films (W. L. Gore & Associates, Inc.) mit einer Dicke von etwa 50 µm und einer Porosität, gemessen

in Gurley-Sekunden von etwa 22 bis 24, wurde mit Isopropylalkohol vernetzt und dann etwa 5 Minuten lang in eine Lösung von etwa 1 % Polyvinylalkohol (PVA) (Sigma) in destilliertem Wasser (Gewicht/Volumen) eingetaucht. Diese Film-Konstruktion wurde dann etwa 10 Minuten lang in destilliertes Wasser eingetaucht, um nicht adsorbiertes loses Copolymer von der ePTFE-Oberfläche abzuspielen.

Die adsorbierte Schicht aus PVA wurde in situ auf dem ePTFE-Trägerbestandteil vernetzt, indem die Film-Konstruktion etwa 20 Minuten lang bei etwa 25°C in eine wässrige Lösung von etwa 5 % Glutaraldehyd mit etwa 1 % HCl als Katalysator eingetaucht wurde, um die Vinylalkohol-Gruppen der adsorbierten PVA-Copolymerketten via Acetalisierung zu vernetzen. Diese Film-Konstruktion wurde in Wasser gespült, um überschüssigen Glutaraldehyd und HCl zu entfernen. Die sich ergebende Film-Konstruktion war ein ePTFE-Trägerbestandteil mit einer darauf ausgebildeten ersten Schicht.

#### Beispiel 7

Dieses Beispiel veranschaulicht die Verwendung eines anderen Reagens zur Vernetzung der polymeren grenzflächenaktiven Mittel von Beispiel 6. Das Verfahren ist wie folgt.

Nach der Adsorption des grenzflächenaktiven Mittels an den Oberflächen des ePTFE-Trägerbestandteils in Beispiel 6 wurde die Film-Konstruktion etwa 30 Minuten lang bei etwa 75°C in eine wässrige Lösung von etwa 2 % Polyethylenglykol-dialdehyd (3400 g/Mol, Shearwater Polymers) mit etwa 0,1 % HCl als Katalysator eingetaucht, um die Vinylalkohol-Gruppen der adsorbierten PVA-Copolymerketten via Acetalisierung zu vernetzen. Diese Film-Konstruktion wurde in Wasser gespült, um überschüssigen Polyethylenglykol-dialdehyd und HCl zu entfernen. Die sich ergebende Film-Konstruktion war ein ePTFE-Trägerbestandteil mit einer darauf ausgebildeten ersten Schicht.

### Beispiel 8

5 Dieses Beispiel veranschaulicht die Verwendung eines anderen Reagens zur Vernetzung der polymeren grenzflächenaktiven Mittel von Beispiel 6. Dieses Verfahren ist unter Anpassung aus dem Abaysekara erteilten US-Patent Nr. 5,354,587 übernommen und wird wie folgt durchgeführt.

10 Nach der Adsorption des grenzflächenaktiven Mittels an die Oberflächen des ePTFE-Trägerbestandteils in Beispiel 6 wurde die Film-Konstruktion etwa 30 Sekunden lang in eine methanolische Lösung von etwa 0,25 % Kaliumhydroxid (KOH) eingetaucht, gefolgt von Lufttrocknung. Die Film-Konstruktion wurde dann etwa 5 Minuten lang in eine Aceton-Lösung von etwa 10 % Polyethylenglykol-diglycidylether (400 g/Mol, Polysciences) eingetaucht. Die Film-Konstruktion wurde im Vakuum bei etwa 75°C etwa  
15 3 Stunden lang gehärtet, um die Vinylalkohol-Gruppen der adsorbierten PVA-Copolymerketten via Epoxid-Alkoholyse zu vernetzen. Die Film-Konstruktion wurde in destilliertem Wasser gespült, um überschüssigen Polyethylenglykol-diglycidylether und KOH zu entfernen. Die sich ergebende Film-Konstruktion war ein ePTFE-Trägerbestandteil mit einer darauf  
20 ausgebildeten ersten Schicht.

### Beispiel 9

25 Dieses Beispiel veranschaulicht die Bildung und Bindung einer zweiten Schicht, bestehend aus dem hydrophilen Polymer Polyvinylalkohol (PVA), an die auf dem ePTFE-Trägerbestandteil ausgebildete erste Schicht, wie in Beispiel 1 beschrieben.

30 Die Film-Konstruktion von Beispiel 1 wurde etwa 5 Minuten lang bei etwa 75°C in eine wässrige Lösung von etwa 1,0 % Polyvinylalkohol (PVA) (Sigma), mit etwa 1 % HCl als Katalysator, eingetaucht, um eine kovalente Bindung von PVA an freie Aldehyd-Gruppen, die nach der Vernetzung der ersten Schicht übrig blieben, zu erlauben. Nach der Bindung der zweiten

Schicht an die erste Schicht über Acetal-Bindungen wurde überschüssiger PVA von der Film-Konstruktion durch Eintauchen der Konstruktion in Wasser abgespült. Die sich ergebende Film-Konstruktion war sofort und spontan mit flüssigem Wasser benetzbar.

#### Beispiel 10

Dieses Beispiel veranschaulicht die Bildung und Bindung einer zweiten Schicht, bestehend aus dem hydrophilen Polymer Polyvinylalkohol (PVA), an die erste Schicht, die, wie in Beispiel 6 beschrieben, auf dem ePTFE-Trägerbestandteil ausgebildet war.

Die Film-Konstruktion von Beispiel 6 wurde bei etwa 25°C etwa 10 Minuten lang in eine wässrige Lösung von etwa 1,0 % Polyvinylalkohol (PVA) (Sigma), mit etwa 1 % HCl als Katalysator, eingetaucht, um eine kovalente Bindung von PVA an freie Aldehyd-Gruppen, die nach der Vernetzung der ersten Schicht übrig geblieben waren, zu erlauben. Nach der Bindung der zweiten Schicht an die erste Schicht via Acetal-Bindungen wurde überschüssiger PVA von der Film-Konstruktion durch Eintauchen der Konstruktion in Wasser abgespült. Die sich ergebende Film-Konstruktion war sofort und spontan mit flüssigem Wasser benetzbar.

#### Beispiel 11

Dieses Beispiel veranschaulicht die Bildung und Bindung einer zweiten Schicht, bestehend aus dem hydrophilen Polymer Polylysin, an die erste Schicht, die, wie in Beispiel 1 beschrieben, auf dem ePTFE-Trägerbestandteil ausgebildet worden war.

Die Film-Konstruktion von Beispiel 1 wurde bei etwa 25°C etwa 2 Stunden lang in eine gepufferte wässrige Lösung von etwa 0,5 % Polylysin-hydrobromid (100.000 g/Mol, Sigma) bei etwa pH 9 eingetaucht, um eine kovalente Bindung von Polylysin an freie Oberflächen-Aldehydgruppen, die

während der Vernetzung der ersten Schicht erzeugt worden waren, zu erlauben. Cyanoborhydrid wurde zugegeben, um die Imin-Verknüpfung zu einem sekundären Amin zu reduzieren. Nach der Bindung der zweiten Schicht an die erste Schicht via Imin-Bindungen wurde überschüssiges Polylysin durch Eintauchen der Film-Konstruktion in destilliertes Wasser abgewaschen. Die sich ergebende Film-Konstruktion war sofort und spontan wasserbenetzbar.

#### Beispiel 12

Dieses Beispiel veranschaulicht die Bildung und Bindung einer zweiten Schicht, bestehend aus dem hydrophilen Polymer Polylysin, an die erste Schicht, die, wie in Beispiel 6 beschrieben, auf dem ePTFE-Trägerbestandteil ausgebildet worden war.

Die Film-Konstruktion von Beispiel 6 wurde bei etwa 25°C etwa 2 Stunden lang in eine gepufferte wässrige Lösung von etwa 0,5 % Polylysinhydrobromid (100.000 g/Mol, Sigma) bei etwa pH 9 eingetaucht, um eine kovalente Bindung von Polylysin an freie Oberflächen-Aldehydgruppen, die während der Vernetzung der ersten Schicht gebildet wurden, zu erlauben. Nach der Bindung der zweiten Schicht an die erste Schicht via Imin-Bindungen wurde überschüssiges Polylysin durch Eintauchen der Film-Konstruktion in destilliertes Wasser abgewaschen. Cyanoborhydrid wurde zugegeben, um die Imin-Bindung zu einem sekundären Amin zu reduzieren. Die sich ergebende Film-Konstruktion war sofort und spontan wasserbenetzbar.

#### Beispiel 13

Dieses Beispiel veranschaulicht die Stabilität der ersten und zweiten Schicht der in Beispiel 9 beschriebenen Film-Konstruktion. Bei dem Stabilitäts-Test wurde die Film-Konstruktion von Beispiel 9 etwa 2 Tage lang bei etwa 120°C in Dimethylformamid (DMF) extrahiert. Unter Verwendung von Gravimetrie wurde keine statistisch signifikante Verringerung der Masse der

Konstruktion beobachtet, was keine nachweisbare Desorption der ersten und zweiten Schicht von der Oberfläche des Trägerbestandteils anzeigt. Diese Film-Konstruktion benetzte spontan und vollständig mit flüssigem Wasser. Als ein Ergebnis wurde die Oberfläche der Film-Konstruktion als stabil hydrophil betrachtet.

Bei einem anderen Stabilitäts-Test der ersten und zweiten Schicht der Film-Konstruktion von Beispiel 9 wurde die Film-Konstruktion etwa 2 Tage lang bei etwa 80°C in etwa 5 %-ige HCl eingetaucht, in Wasser gespült und dann luftgetrocknet. Nach dieser Behandlung blieb die Film-Konstruktion hydrophil.

#### Beispiel 14

Dieses Beispiel veranschaulicht die Stabilität der ersten und zweiten Schicht der in Beispiel 10 beschriebenen Film-Konstruktion. Bei dem Stabilitäts-Test wurde die Film-Konstruktion von Beispiel 10 etwa 1 Tag lang bei etwa 120°C in Dimethylformamid (DMF) extrahiert. Unter Verwendung von Gravimetrie wurde keine statistisch signifikante Verringerung der Masse der Konstruktion beobachtet, was keine nachweisbare Desorption der ersten und zweiten Schicht von der Oberfläche des Trägerbestandteils anzeigt. Diese Film-Konstruktion benetzte spontan und vollständig mit flüssigem Wasser. Als ein Ergebnis wurde die Oberfläche der Film-Konstruktion als stabil hydrophil betrachtet.

Bei einem anderen Stabilitäts-Test der ersten und zweiten Schicht der Film-Konstruktion von Beispiel 10 wurde die Film-Konstruktion etwa 2 Tage lang bei etwa 80°C in etwa 5 %-ige HCl eingetaucht, in Wasser gespült und dann luftgetrocknet. Nach dieser Behandlung blieb die Film-Konstruktion hydrophil.

## Beispiel 15

5 Dieses Beispiel veranschaulicht die Stabilität der ersten und zweiten Schicht  
der in Beispiel 9 beschriebenen Film-Konstruktion. Bei dem Stabilitäts-Test  
wurde die Film-Konstruktion von Beispiel 9 etwa 7 Tage lang bei etwa  
25°C in destilliertem Wasser extrahiert. Unter Verwendung von Gravimetrie  
wurde keine statistisch signifikante Verringerung der Masse der Konstrukti-  
on beobachtet, was keine nachweisbare Desorption der ersten und zweiten  
10 Schicht von der Oberfläche des Trägerbestandteils anzeigt. Diese Film-  
Konstruktion benetzte spontan und vollständig mit flüssigem Wasser. Als  
ein Ergebnis wurde die Oberfläche der Film-Konstruktion als stabil hy-  
drophil betrachtet.

## Beispiel 16

15 Dieses Beispiel veranschaulicht die Stabilität der ersten und zweiten Schicht  
der in Beispiel 10 beschriebenen Film-Konstruktion. Bei dem Stabilitäts-  
Test wurde die Film-Konstruktion von Beispiel 10 etwa 7 Tage lang bei  
etwa 25°C in destilliertem Wasser extrahiert. Unter Verwendung von Gra-  
vimetrie wurde keine statistisch signifikante Verringerung der Masse der  
20 Konstruktion beobachtet, was keine nachweisbare Desorption der ersten und  
zweiten Schicht von der Oberfläche des Trägerbestandteils anzeigt. Diese  
Film-Konstruktion benetzte spontan und vollständig mit flüssigem Wasser.  
Als ein Ergebnis wurde die Oberfläche der Film-Konstruktion als stabil hy-  
25 drophil betrachtet.

## Beispiel 17

30 Dieses Beispiel veranschaulicht das Fehlen einer verringerten Permeabilität  
einer Film-Konstruktion, wie sie in Beispiel 9 beschrieben ist. Zur Bewer-  
tung der Permeabilität der Film-Konstruktion wurden zuerst rasterelektro-  
nenmikroskopische Aufnahmen der Mikrostruktur der Film-Konstruktion  
gemacht, um die erste und zweite Schicht auf den Knoten und Fibrillen des

ePTFE-Trägerbestandteils zu betrachten. Die Ergebnisse dieser mikroskopischen Aufnahmen zeigten kein sichtbares Verstopfen von Poren oder lose Abscheidung von grenzflächenaktivem Mittel darin (siehe Fig. 5). Dies ist ein Hinweis, dass die Adsorption und Vernetzung der ersten Schicht und die Bindung der zweiten Schicht sehr dünn war.

Um weiterhin zu zeigen, dass mit grenzflächenaktivem Mittel behandeltes ePTFE den Widerstand gegen Massentransport durch Verstopfen von Poren nicht erhöht, wurde die Porengröße unter Verwendung eines Coulter-Porometers gemessen. Eine Film-Konstruktion wurde hergestellt, wie in Beispiel 9 beschrieben, und zur Herstellung eines Schlauchs spiralg um einen zylindrischen Dorn gewickelt. Für die mittlere Porengröße der Film-Schlauch-Konstruktion wurden  $0,173 \pm 0,006 \mu\text{m}$  gemessen, während für die mittlere Porengröße eines ähnlichen unbehandelten ePTFE-Schlauchs  $0,180 \pm 0,001 \mu\text{m}$  gemessen wurden. Diese Daten zeigen kein statistisch signifikantes Blockieren von Poren aufgrund der ersten und zweiten Schicht an.

Um weiterhin zu zeigen, dass ein ePTFE-Trägerbestandteil mit einer ersten und zweiten Schicht der vorliegenden Erfindung den Widerstand gegen Massentransport durch Verstopfen von Poren nicht erhöht, wurde die Durchlässigkeit der Film-Konstruktion für Glukosefluss gemessen. Um die Durchlässigkeit der Film-Konstruktion für Glukosefluss zu testen, wurde eine ePTFE-Film-Schlauch-Konstruktion hergestellt, wie vorher beschrieben. Für den Glukose-Massentransport-Koeffizienten der Film-Schlauch-Konstruktion wurden  $0,98 \mu\text{m/s}$  gemessen, während für den Glukose-Massentransport-Koeffizienten eines ähnlichen unbehandelten ePTFE-Schlauchs  $0,25 \mu\text{m/s}$  gemessen wurden. Diese Daten zeigen an, dass die Diffusion von Glukose durch die Film-Schlauch-Konstruktion der vorliegenden Erfindung größer war als für das unbehandelte Material aufgrund des Vorliegens einer kontinuierlicheren Wasserphase in den Poren, die die Dicke des Trägerbestandteils durchquerte.



## Beispiel 18

5 Dieses Beispiel veranschaulicht die Immobilisierung einer bioaktiven Spezies in der Form von Peptiden an einer Film-Konstruktion der vorliegenden Erfindung, wie in Beispiel 10 beschrieben. Um das Verfahren zu beginnen, wurde die Film-Konstruktion von Beispiel 10 etwa 60 Minuten lang in eine Aceton-Lösung, die etwa 5 % Carbonyldiimidazol (Sigma) enthielt, eingetaucht, um Vinylalkohol-Gruppen in reaktive Imidazol-carbamate umzuwandeln. Die Film-Konstruktion wurde in Aceton gespült, dann etwa 10 24 Stunden lang bei etwa 4°C in eine gepufferte Lösung von etwa 0,1 % Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (Sigma) bei etwa pH 9 eingetaucht, um eine Konjugation des Peptids an die Imidazol-carbamate zu erlauben. Überschüssige Imidazol-Gruppen wurden via Hydrolyse in Wasser bei etwa pH 7,4 für etwa 24 Stunden in Vinylalkohol-Gruppen rückgewandelt.

15

## Beispiel 19

20 Dieses Beispiel veranschaulicht auch die Immobilisierung einer bioaktiven Spezies in der Form von Peptiden an einer Film-Konstruktion der vorliegenden Erfindung, wie in Beispiel 9 beschrieben. Um das Verfahren zu beginnen, wurde die Film-Konstruktion vom Beispiel 9 etwa 1 Stunde lang in eine Dimethylformamid(DMF)-Lösung, die etwa 10 % Hexamethylen-diisocyanat (Aldrich) mit etwa 0,5 % Dimethylaminopyridin als Katalysator enthielt, eingetaucht, um freie Isocyanat-Gruppen auf der PVA-Schicht anzubringen (Protokoll angepasst aus A. Kondoh, K. Makino, T. Matsuda, 25 "Two-Dimensional Artificial Extracellular Matrix: Bioadhesive Peptide-Immobilized Surface Design", J. Applied Polym. Sci., 47: 1983 (1993)). Die Film-Konstruktion wurde dann in wässriger 1M KOH gespült, um die freien Isocyanate zu freien Aminen zu hydrolysieren, worauf sie etwa 1 Stunde lang in eine DMF-Lösung, die etwa 0,5 % Disuccinimidyl-suberat (Pierce) 30 enthielt, eingetaucht wurde, um freie Succinimidyl-Gruppen an den freien Aminen anzubringen. Die Film-Konstruktion wurde in DMF gespült, dann etwa 12 Stunden lang in eine gepufferte Lösung von etwa 0,1 % Gly-Arg-

Gly-Asp-Ser (Sigma) bei etwa pH 9 eingetaucht, um eine Konjugation des Peptids an die freien Succinimidyl-Gruppen zu erlauben.

#### Beispiel 20

5

10

15

20

Dieses Beispiel veranschaulicht auch die Immobilisierung einer bioaktiven Spezies in der Form von Peptiden an eine Film-Konstruktion der vorliegenden Erfindung, wie in Beispiel 9 beschrieben. Um das Verfahren zu beginnen, wurde die Film-Konstruktion von Beispiel 9 etwa 15 Minuten lang bei etwa 80°C in eine Lösung von etwa 5 % Glyoxylsäure (Sigma) mit 1 % HCl als Katalysator eingetaucht, um den PVA der zweiten Schicht zu acetalisieren, wodurch freie Carbonsäure-Gruppen konjugiert wurden. Die Film-Konstruktion wurde dann etwa 2 Stunden lang in eine Aceton-Lösung von etwa 1 % N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(N-succinimidyl)uronium-tetrafluoroborat (Fluka) mit etwa 0,25 % Dimethylaminopyridin als Katalysator eingetaucht, um die Carbonsäuren in reaktive Succinimidyl-Ester umzuwandeln. Die Film-Konstruktion wurde in Aceton gespült, dann etwa 24 Stunden lang in eine gepufferte Lösung von etwa 0,1 % Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (Sigma) bei etwa pH 9 eingetaucht, um die Konjugation des Peptids an die Succinimidyl-Gruppen zu erlauben.

#### Beispiel 21

25

30

Dieses Beispiel veranschaulicht auch die Immobilisierung einer bioaktiven Spezies in der Form von Peptiden an eine Film-Konstruktion der vorliegenden Erfindung, wie in Beispiel 9 beschrieben. Um das Verfahren zu beginnen, wurde die Film-Konstruktion von Beispiel 9 etwa 10 Minuten lang bei etwa 80°C in eine Lösung von etwa 5 % Glyoxylsäure mit etwa 1 % HCl als Katalysator eingetaucht, um freie Carbonsäure-Gruppen an der PVA-Schicht anzubringen. Die Film-Konstruktion wird etwa 1 Stunde lang bei etwa 4°C in eine wässrige gepufferte Lösung von etwa 1 % 1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) (Sigma) bei etwa pH 5 eingetaucht, um die Carbonsäuren in reaktive O-Acyhlarnstoffe umzuwandeln. Die Film-

Konstruktion wird in der gepufferten Lösung gespült, dann etwa 24 Stunden lang in die gepufferte Lösung mit etwa 0,1 % Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (Sigma) bei etwa pH 9 eingetaucht, um eine Konjugation des Peptids an die O-Acylharnstoffe zu erlauben.

5

#### Beispiel 22

10

15

20

25

Dieses Beispiel veranschaulicht die Immobilisierung einer bioaktiven Spezies in der Form von Zellen an eine Film-Konstruktion der vorliegenden Erfindung, wie in Beispiel 18 beschrieben. Um das Verfahren zu beginnen, wurde die Film-Konstruktion von Beispiel 18 mit Ratten-Insulinoma-Zellen in Zellkultur-Medium beimpft. Diese Zellen haben Rezeptoren, die den Zellen helfen, sich an bestimmte Substrate oder Liganden anzuheften. Der in Beispiel 18 beschriebene Ligand Gly-Arg-Gly-Asp-Ser ist allgemein dafür bekannt, an Rezeptoren an Zellen, die bei der Anhaftung der Zelle an anderen Zellen oder anderen Substraten beteiligt sind, zu binden. Bei der vorliegenden Erfindung wurde der Arg-Gly-Asp-Ligand verwendet, um die Ratten-Insulinoma-Zellen an der Film-Konstruktion von Beispiel 18 zu immobilisieren. Als ein Vergleich wurden jeweils unmodifiziertes ePTFE, mit Polyvinylalkohol als einem grenzflächenaktiven Mittel modifiziertes ePTFE gemäß Beispiel 10, aber ohne Gly-Arg-Gly-Asp-Ser, und Gewebekultur-Polystyrol mit denselben Zellen beimpft. Wegen der Inertheit, Hydrophobie und dem glatten Gefüge von ePTFE haften Zellen nicht leicht an ePTFE, wenn überhaupt. Gewebekultur-Polystyrol wird allgemein als ein Substrat für eine breite Vielfalt von Zellen in Gewebekultur verwendet. Das Ausmaß der Zell-Anheftung wurde 12 Stunden nach der Zell-Beimpfung durch Sichtbarmachen der Zellen unter Phasenkontrastmikroskopie quantitativ bestimmt.

30

Die Ergebnisse dieser Tests zeigten, dass Gewebekultur-Polystyrol das Ausbreiten aller beimpften Zellen nach 12 Stunden unterstützte, wie erwartet. Ähnliche Ergebnisse sah man bei der Film-Konstruktion von Beispiel 18. Unmodifiziertes ePTFE und PVA-modifiziertes ePTFE, hergestellt gemäß

Beispiel 10, trugen jedoch nach 12 Stunden weniger als 5 % verteilte Zellen. Diese Daten zeigen, unter anderem, dass die Immobilisierung von Zellen an ePTFE durch das Immobilisieren bioaktiver Liganden, für die die Zellen Rezeptoren besitzen, an der ePTFE-Oberfläche erhöht wurde. Die Daten zeigen auch, dass das Vorliegen einer ersten und zweiten Schicht alleine die Zell-Immobilisierung nicht verbesserte.

### Beispiel 23

10 Eine Zellen-Einkapselungsvorrichtung des Typs, der von Butler et al. in WO 95/04521 und in der anhängigen US-Patentanmeldung Serien-Nr. 08/532,925, eingereicht am 22. September 1995, mit dem Titel "Improved Cell Encapsulation Device", die hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird, offenbart wird, wurde hergestellt unter Verwendung der Film-  
15 Konstruktion von Beispiel 10 als die Zellen-Einkapselungsmembran oder Abdeckung der Vorrichtung. Bei bevorzugten Ausführungsformen der Vorrichtung von Butler et al. ist die Geometrie im Wesentlichen zylindrisch. Ein wichtiges Merkmal der Vorrichtung ist ein zellenverdrängender Kern, der im Zentrum der Vorrichtung angeordnet ist, um Zellen vom Zentrum der  
20 Vorrichtung entfernt nahe der Zell-Einkapselungsmembran anzubringen, wo ein maximaler Austausch von Nährstoffen, Gasen, Abfallstoffen und Zellprodukten zwischen in der Vorrichtung eingekapselten Zellen und der äußeren Umgebung der Vorrichtung stattfinden kann.

25 Eine Film-Konstruktion, wie sie in Beispiel 10 beschrieben ist, wurde hergestellt und spiralig auf einen zylindrischen Dorn gewickelt, um einen Schlauch oder eine Abdeckung von etwa 3 cm Länge mit einem Innendurchmesser von etwa 1,7 cm herzustellen. Ein Hydrogel-Stab oder Kern, etwa 3 cm lang, mit einem Außendurchmesser von etwa 1,6 cm wurde in  
30 den Schlauch eingefügt. Der Schlauch wurde an einem Ende verschlossen durch Anbringen einer einschnürenden Silikonkautschuk-Manschette über dem Schlauch und dem Kern (siehe Fig. 8). Unter Verwendung einer Spritze wurde die Vorrichtung mit einer Aufschlämmung von anhaftungs-unabhän-

gigen Ratten-Insulinoma-Zellen in Zellkultur-Medium gefüllt. Das verbleibende offene Ende des Schlauchs wurde unter Verwendung von einschnürenden Silikonkautschuk-Manschetten verschlossen, um ein Austreten von Zellen aus dem Schlauch heraus zu verhindern.

5

10

15

20

Als die Zellen in die Vorrichtung geladen wurden, bewirkten die erste und die zweite Schicht der Film-Konstruktion des Schlauchs ein spontanes Benetzen des Schlauchs, wenn er dem Kulturmedium ausgesetzt wurde. Als der Schlauch mit dem wässrigen Anteil des Kulturmediums benetzt wurde, wurde der Schlauch transparent, was ein Sichtbarwerden der darin enthaltenen Zellen erlaubte. Die Zell-Einkapselungsvorrichtung wurde unter Verwendung von Standard-Zellkultur-Techniken *in vitro* gehalten. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde durch Überwachung des Glukosemetabolismus bewertet. Die Zellen blieben, während sie in der Vorrichtung eingeschlossen waren, für bis zu 3 Wochen lebensfähig und erzeugten Milchsäure via Glykolyse. Diese Ergebnisse zeigen die Anwesenheit einer kontinuierlichen Wasserphase durch die Film-Konstruktion der vorliegenden Erfindung, die ausreichend ist für die Diffusion von Nährstoffen, Gasen und Abfallstoffen, dass die Zellen lebensfähig bleiben. Die Ergebnisse zeigen auch, dass die Film-Konstruktion der vorliegenden Erfindung für Zellen nicht toxisch war.

#### Beispiel 24

25

30

Viele für die Biotechnologie brauchbare Säugetierzellen sind anhaftungsabhängig. Für eine ordnungsgemäße Gesundheit dieser Zellen müssen die Zellen eine geeignete Oberfläche zum darauf Anhaften und Verteilen haben. Wenn die Zellen nicht mit einer geeigneten Oberfläche versehen werden, kann ihr Stoffwechselertrag verringert werden und unter extremen Umständen kann Zelltod eintreten. Das vorliegende Beispiel veranschaulicht, dass eine Membran, wie sie in Beispiel 18 beschrieben ist und zu einer Anordnung gemäß Beispiel 23 geformt ist, auch die Lebensfähigkeit von anhaftungsabhängigen glatten Muskelzellen aufrechterhalten kann.

5 Zu Anfang wurden zwei Film-Schlauch-Konstruktionen hergestellt. Eine  
erste Konstruktion wurde hergestellt, wie in Beispiel 18 beschrieben, mit  
dem Peptid-Liganden Gly-Arg-Gly-Asp-Ser. Eine zweite Konstruktion ähn-  
lich dem Beispiel 10 wurde hergestellt. Jede Film-Konstruktion wurde nach  
10 der Behandlung im Autoklaven zu einer Zell-Einkapselungsvorrichtung ge-  
mäß Beispiel 23 geformt. Ein Hydrogel-Kern in der Form eines Stabs wurde  
in jede schlauchförmige Zell-Einkapselungsvorrichtung eingesetzt. Ein Ende  
jeder Vorrichtung wurde mit einer einschnürenden Silikonkautschuk-Man-  
schette verschlossen, wie es in Beispiel 23 beschrieben ist. Jede Vorrichtung  
15 wurde mit einer Aufschlammung von glatten Muskelzellen von Hunden in  
Zellkulturmedium gefüllt. Das verbleibende offene Ende jeder Vorrichtung  
wurde unter Verwendung von einschnürenden Silikonkautschuk-Manschet-  
ten verschlossen, um einen Austritt von Zellen aus der Vorrichtung zu ver-  
hindern. Die Film-Schlauch-Konstruktion beider Zell-Einkapselungsvorrich-  
tungen benetzte spontan, wenn sie dem Kulturmedium ausgesetzt wurde.  
Die benetzten Film-Schlauch-Konstruktionen wurden transparent und er-  
laubten das Sichtbarwerden der in der Vorrichtung enthaltenen Zellen. Beide  
Zell-Einkapselungsvorrichtungen wurden unter Verwendung von Standard-  
Zellkultur-Techniken in vitro gehalten.

20 Der morphologische Zustand der Zellen wurde durch Phasenkontrastmikro-  
skopie bewertet. In der zweiten Film-Konstruktion immobilisierte Zellen  
waren nicht auf der Oberfläche der Konstruktion verteilt, wobei nach 4 Ta-  
gen in Kultur viele Zelltrümmer beobachtet wurden. In der ersten Film-  
25 Konstruktion immobilisierte Zellen wurden an der Oberfläche der Film-  
Schlauch-Konstruktion verteilt. Die Zellen blieben für bis zu 16 Wochen an  
der Oberfläche der ersten Film-Konstruktion verteilt. Diese Daten legen  
nahe, dass für die Immobilisierung bestimmter Zelltypen das Vorhandensein  
einer kontinuierlichen Wasserphase für den Transport von Nährstoffen un-  
passend für ihre Morphologie und Immobilisierung sein kann. Oberflächen-  
30 gebundene bioaktive Liganden können für die richtige Morphologie und  
Lebensfähigkeit von immobilisierten anhaftungs-abhängigen Zelltypen not-  
wendig sein.

## Beispiel 25

Bei der vorliegenden Erfindung können Abstandhalter-Arme als ein Halter  
5 oder Verbinder vorgesehen werden, um einen physikalischen Raum zwischen der bioaktiven Spezies und der zweiten Schicht zu schaffen, um sterische Beschränkungen zwischen diesen zwei Bestandteilen zu mildern. Eine Vielfalt hydrophiler und hydrophober Abstandhalter-Arme kann unter Verwendung von Techniken, die Fachleuten bekannt sind, an die Vielschicht-  
10 Struktur gebunden werden. Beispielsweise wurde die Film-Konstruktion von Beispiel 9 etwa 5 Minuten lang bei etwa 80°C in eine wässrige Lösung von etwa 5 % Polyethylenglykol-dialdehyd (3400 g/Mol, Shearwater Polymers) mit 1 % HCl als Katalysator eingetaucht, um freie Aldehyd-Gruppen an der PVA-Oberfläche, gehalten von einer PEG-Kette, anzubringen. Dann  
15 wurden bioaktive Spezies unter Verwendung von Techniken, die Fachleuten bekannt sind, an diesen freien Aldehyden immobilisiert.

## Beispiel 26

20 Unter Verwendung des Protokolls von Beispiel 18 wurde ein Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Ligand an der luminalen Oberfläche eines ePTFE-Gefäßtransplantats (W. L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ) immobilisiert. Nach der Behandlung im Autoklaven wurde das Transplantat mit Hunde-Endothelzellen beimpft. Die Zellen wurden 10 Tage lang in Kultur anhaften lassen. Die  
25 Anhaftung der Endothelzellen wurde bewertet unter Verwendung eines Farbstoffs, der spezifisch ist für endotheliale Lipoprotein(LDL)-Vakuolen niederer Dichte (Biomedical Technologies). Der LDL-Farbstoff zeigte eine konfluierende Monoschicht funktioneller Endothelzellen, die die gesamte behandelte Oberfläche des Gefäßtransplantats bedeckten.

30

## Beispiel 27

Ein Gefäßtransplantat mit einem Innendurchmesser von 6 mm, das gemäß Beispiel 26 hergestellt worden war, wurde für 2 Stunden als ein Oberschenkel-Kniekehlen-Arterienbypass in einen Windhund transplantiert. Bei dem Experiment wurden keine gerinnungshemmenden Mittel verwendet. Am Ende des Zeitraums von 2 Stunden wurde das Transplantat entfernt und auf die Anwesenheit von Endothelzellen, die an der luminalen Oberfläche des Transplantats immobilisiert waren, untersucht. Endothelzellen wurden nach dem 2-stündigen Test an der luminalen Oberfläche des Gefäßtransplantats beobachtet. Wenig oder keine Thrombus-Bildung wurde an der luminalen Oberfläche des Transplantats beobachtet.

## Beispiel 28

Wie in Beispiel 22 gezeigt wurde, können anhaftungs-abhängige Zelltypen die Anwesenheit eines oberflächengebundenen Peptidfaktors zur Immobilisierung erfordern. Zellen wurden nicht an dem unbehandelten hydrophoben ePTFE-Trägerbestandteil immobilisiert, sondern wurden an das Zweischicht-PVA-System mit der darauf immobilisierten bioaktiven Spezies Gly-Arg-Gly-Asp-Ser, wie in Beispiel 22, gebunden. Daher können Zellen in einem Muster an einem Trägerbestandteil immobilisiert werden, indem man die erste Schicht, die zweite Schicht und die bioaktive Spezies an spezifischen Stellen auf dem Trägerbestandteil anbringt.

Beispielsweise wurde eine Konstruktion von Beispiel 10 sandwichartig zwischen zwei anderen identischen Membranen angeordnet. Ein Gummistempel mit einem bestimmten Muster wurde mit Isopropylalkohol benetzt. Der Isopropylalkohol wurde auf das Membran-"Sandwich" aufgebracht, um alle ePTFE-Schichten nur mit dem Muster des Stempels zu benetzen. Das Membran-Sandwich wurde dann gemäß dem Protokoll von Beispiel 18 behandelt, um das Peptid in der Gestalt des Musters auf dem Gummistempel zu konjugieren. Die zentrale Membran wurde von der Sandwich-Anordnung



entfernt und mit Hunde-Endothelzellen beimpft. Nach 12 Stunden waren die Zellen in der Gestalt des Musters immobilisiert. Es waren keine Zellen zu sehen, die an dem Bereich des ePTFE-Trägerbestandteils anhafteten, wo das konjugierte Peptid nicht immobilisiert worden war. Die immobilisierten Hundezellen blieben für mindestens 4 Wochen lebensfähig, immobilisiert und auf den Musterbereich des Trägerbestandteils beschränkt. Siehe beispielsweise Fig. 10.

#### Beispiel 29

Dieses Beispiel veranschaulicht die vorliegende Erfindung mit einem Trägerbestandteil bestehend aus einem Polyester-Material. Ein Film aus Polyester (Poretics) wird zuerst in Isopropanol eingetaucht, um die Membran zu benetzen. Dann wird der Film in eine Lösung von 1 % Polyvinylalkohol (PVA) (Sigma) etwa 5 Minuten lang eingetaucht, um Adsorption des PVA zu erlauben. Als nächstes wird der Film etwa 10 Minuten lang in deionisiertem Wasser gespült. Zuletzt wird der Film etwa 20 Minuten lang in eine Lösung von etwa 5 % Glutaraldehyd und etwa 1 % HCl eingetaucht, um den PVA *in situ* zu vernetzen. Die sich ergebende Film-Konstruktion ist ein Polyester-Trägerbestandteil mit einer darauf ausgebildeten ersten Schicht.

#### Beispiel 30

Dieses Beispiel veranschaulicht die vorliegende Erfindung mit einem Trägerbestandteil bestehend aus einem Polycarbonat-Material. Ein Film aus Polycarbonat (Poretics) wird zuerst in Isopropanol eingetaucht, um die Membran zu benetzen. Dann wird der Film etwa 5 Minuten lang in eine Lösung von 1 % Polyvinylalkohol (PVA) (Sigma) eingetaucht, um die Adsorption des PVA zu erlauben. Als nächstes wird der Film etwa 10 Minuten lang in deionisiertem Wasser gespült. Zuletzt wird der Film etwa 20 Minuten lang in eine Lösung von etwa 5 % Glutaraldehyd und etwa 1 % HCl eingetaucht, um den PVA *in situ* zu vernetzen. Die sich ergebende Film-

Konstruktion ist ein Polycarbonat-Trägerbestandteil mit einer darauf ausgebildeten ersten Schicht.

#### Beispiel 31

5

10

15

Dieses Beispiel veranschaulicht die vorliegende Erfindung mit einem Trägerbestandteil bestehend aus einem Polyethylen-Material. Ein Film aus Polyethylen (Whatman) wird zuerst in Isopropanol eingetaucht, um die Membran zu benetzen. Dann wird der Film etwa 5 Minuten lang in eine Lösung von 1 % Polyvinylalkohol (PVA) (Sigma) eingetaucht, um die Adsorption des PVA zu erlauben. Als nächstes wird der Film etwa 10 Minuten lang in deionisiertem Wasser gespült. Zuletzt wird der Film etwa 20 Minuten lang in eine Lösung von etwa 5 % Glutaraldehyd und etwa 1 % HCl eingetaucht, um den PVA *in situ* zu vernetzen. Die sich ergebende Film-Konstruktion ist ein Polyethylen-Trägerbestandteil mit einer darauf ausgebildeten ersten Schicht.

#### Beispiel 32

20

25

30

Dieses Beispiel veranschaulicht die vorliegende Erfindung mit einem Trägerbestandteil bestehend aus einem Polyvinylidenfluorid-Material. Ein Film aus Polyvinylidenfluorid (Millipore) wird zuerst in Isopropanol eingetaucht, um die Membran zu benetzen. Der Film wird dann etwa 5 Minuten lang in eine Lösung von 1 % Polyvinylalkohol (PVA) (Sigma) eingetaucht, um die Adsorption des PVA zu erlauben. Als nächstes wird der Film etwa 10 Minuten lang in deionisiertem Wasser gespült. Zuletzt wird der Film etwa 20 Minuten lang in eine Lösung von etwa 5 % Glutaraldehyd und etwa 1 % HCl eingetaucht, um den PVA *in situ* zu vernetzen. Die sich ergebende Film-Konstruktion ist ein Polyvinylidenfluorid-Trägerbestandteil mit einer darauf ausgebildeten ersten Schicht.

## Beispiel 33

5 Dieses Beispiel veranschaulicht die vorliegende Erfindung mit einem Trägerbestandteil bestehend aus Silbermetall. Eine Membran aus Silbermetall (Poretics) wird zuerst in Isopropanol eingetaucht, um das Metall zu benetzen. Das Metall wird dann etwa 5 Minuten lang in eine Lösung von 1 % Polyvinylalkohol (PVA) (Sigma) eingetaucht, um die Adsorption des PVA zu erlauben. Als nächstes wird das Metall etwa 10 Minuten lang in deionisiertem Wasser gespült. Zuletzt wird das Metall etwa 20 Minuten lang in eine Lösung von etwa 5 % Glutaraldehyd und etwa 1 % HCl eingetaucht, um den PVA *in situ* zu vernetzen. Die sich ergebende Film-Konstruktion ist ein Silbermetall-Trägerbestandteil mit einer darauf ausgebildeten ersten Schicht.

## 15 Beispiel 34

20 Dieses Beispiel veranschaulicht die vorliegende Erfindung mit einem Trägerbestandteil bestehend aus einem Zelluloseacetat-Material. Ein Film aus Zelluloseacetat (Millipore) wird zuerst in Isopropanol eingetaucht, um die Membran zu benetzen. Der Film wird dann etwa 5 Minuten lang in eine Lösung von 1 % Polyvinylalkohol (PVA) (Sigma) eingetaucht, um die Adsorption des PVA zu erlauben. Als nächstes wird der Film etwa 10 Minuten lang in deionisiertem Wasser gespült. Zuletzt wird der Film etwa 20 Minuten lang in eine Lösung von etwa 5 % Glutaraldehyd und etwa 1 % HCl eingetaucht, um den PVA *in situ* zu vernetzen. Die sich ergebende Film-Konstruktion ist ein Zelluloseacetat-Trägerbestandteil mit einer darauf ausgebildeten ersten Schicht.

## 30 Beispiel 35

Dieses Beispiel veranschaulicht die Immobilisierung einer bioaktiven Spezies in der Form von Peptiden an einer Film-Konstruktion der vorliegenden Erfindung, wie in Beispiel 30 beschrieben. Der Film von Beispiel 30 wird

zusätzlich gemäß Beispiel 10 behandelt, um eine zweite Schicht darauf anzubringen. Der Film wird dann mit dem bioaktiven Peptid Gly-Arg-Gly-Asp-Ser gemäß Beispiel 18 immobilisiert. Die sich ergebende Film-Konstruktion ist ein Polycarbonat-Trägerbestandteil mit der daran immobilisierten bioaktiven Spezies Gly-Arg-Gly-Asp-Ser.

#### Beispiel 36

Dieses Beispiel veranschaulicht die Immobilisierung einer bioaktiven Spezies in der Form von Peptiden an einer Film-Konstruktion der vorliegenden Erfindung, wie in Beispiel 31 beschrieben. Der Film von Beispiel 31 wird zusätzlich gemäß Beispiel 10 behandelt, um eine zweite Schicht darauf anzubringen. Der Film wird dann gemäß Beispiel 18 mit dem bioaktiven Peptid Gly-Arg-Gly-Asp-Ser immobilisiert. Die sich ergebende Film-Konstruktion ist ein Polyethylen-Trägerbestandteil mit der daran immobilisierten bioaktiven Spezies Gly-Arg-Gly-Asp-Ser.

#### Beispiel 37

Dieses Beispiel veranschaulicht die Immobilisierung einer bioaktiven Spezies in der Form von Peptiden an einer Film-Konstruktion der vorliegenden Erfindung, wie in Beispiel 32 beschrieben. Der Film von Beispiel 32 wird zusätzlich gemäß Beispiel 10 behandelt, um eine zweite Schicht darauf anzubringen. Der Film wird dann gemäß Beispiel 18 mit dem bioaktiven Peptid Gly-Arg-Gly-Asp-Ser immobilisiert. Die sich ergebende Film-Konstruktion ist ein Polyvinylidenfluorid-Trägerbestandteil mit der daran immobilisierten bioaktiven Spezies Gly-Arg-Gly-Asp-Ser.

#### Beispiel 38

Dieses Beispiel veranschaulicht die Immobilisierung einer bioaktiven Spezies in der Form von Peptiden an einer Film-Konstruktion der vorliegenden Erfindung, wie in Beispiel 33 beschrieben. Der Film von Beispiel 33 wird

zusätzlich gemäß Beispiel 10 behandelt, um eine zweite Schicht darauf anzubringen. Der Film wird dann gemäß Beispiel 18 mit dem bioaktiven Peptid Gly-Arg-Gly-Asp-Ser immobilisiert. Die sich ergebende Film-Konstruktion ist ein Silbermetall-Trägerbestandteil mit der daran immobilisierten bioaktiven Spezies Gly-Arg-Gly-Asp-Ser.

#### Beispiel 39

Dieses Beispiel veranschaulicht die Immobilisierung einer bioaktiven Spezies in der Form von Peptiden an einer Film-Konstruktion der vorliegenden Erfindung, wie in Beispiel 34 beschrieben. Der Film von Beispiel 34 wird zusätzlich gemäß Beispiel 10 behandelt, um eine zweite Schicht darauf anzubringen. Der Film wird dann gemäß Beispiel 18 mit dem bioaktiven Peptid Gly-Arg-Gly-Asp-Ser immobilisiert. Die sich ergebende Film-Konstruktion ist ein Zelluloseacetat-Trägerbestandteil mit der daran immobilisierten bioaktiven Spezies Gly-Arg-Gly-Asp-Ser.

#### Beispiel 40

Dieses Beispiel veranschaulicht die Immobilisierung einer bioaktiven Spezies in der Form von Zellen an eine Film-Konstruktion der vorliegenden Erfindung, wie in Beispiel 36 beschrieben. Die Membran von Beispiel 36 wird gemäß Beispiel 22 mit Zellen beimpft. Die erwarteten Ergebnisse zeigen, dass die Film-Konstruktion von Beispiel 36 die Immobilisierung von Zellen unterstützt, während die unmodifizierten Polypropylen-Filme nicht in der Lage sind, die Immobilisierung von Zellen zu unterstützen.

#### Beispiel 41

Dieses Beispiel veranschaulicht die vorliegende Erfindung mit einem Trägerbestandteil, der aus einer mit expandiertem Polytetrafluorethylen (ePTFE) bedeckten endoluminalen Gefäßprothese in Form eines Verbundmaterials besteht. Zur Herstellung des Verbundmaterials wird eine endolu-

minale Gefäßprothese aus Nitinoldraht mit einem ePTFE-Schlauch bedeckt. Nach der Herstellung wird die Verbundmaterial-Vorrichtung in Isopropylalkohol eingetaucht, um das ePTFE zu benetzen. Dem folgt ein Eintauchen in eine Lösung von etwa 1 % Polyvinylalkohol (PVA) (Sigma) in destilliertem Wasser (Gewicht/Volumen) für etwa 5 Minuten, gefolgt von Waschen in destilliertem Wasser für etwa 10 Minuten, um nicht adsorbiertes loses Copolymer zu entfernen. Der adsorbierte PVA wird gemäß dem in Beispiel 6 beschriebenen vernetzt, um eine erste Schicht auf dem ePTFE-Trägerbestandteil des Verbundmaterials der Gefäßprothese auszubilden. Dann wird unter Verwendung des in Beispiel 12 veranschaulichten Vorgehens eine zweite Schicht auf die erste Schicht aufgebracht. Die nun an dem ePTFE-Trägerbestandteil immobilisierten Amin-Gruppen werden via Aldehyd-Vernetzung an eine gewünschte bioaktive Spezies gebunden. Die sich ergebende Konstruktion ist eine an die erste Schicht gebundene zweite Schicht mit einer darauf immobilisierten bioaktiven Spezies.

#### Beispiel 42

Dieses Beispiel beschreibt ein Verfahren zum Nachweis des Vernetzungsgrades des PVA. Fourier Transform Infrarotspektroskopie wird zum Nachweis der freien Hydroxylgruppen vor und nach der Vernetzung verwendet. Eine Verschiebung in der Position des Hydroxylgruppen(OH)-Peaks von näherungsweise  $3349\text{ cm}^{-1}$  zu näherungsweise  $3383\text{ cm}^{-1}$  unter einer Verringerung der Peak-Höhe ist proportional zum Vernetzungsgrad. Eine Verringerung in der Höhe des Peaks von etwa 50 % und eine Verschiebung von näherungsweise  $3349\text{ cm}^{-1}$  zu näherungsweise  $3383\text{ cm}^{-1}$ , wenn etwa 50 % der Hydroxylgruppen des PVA vernetzt sind.

#### Beispiel 43

Dieses Beispiel veranschaulicht ein Verfahren zum Nachweis außerordentlicher Vernetzung der ersten Schicht, bestehend aus Polyvinylalkohol (PVA), bei einem Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Bei dem Verfahren wur-

de ein erster Gegenstand gemäß Beispiel 6 hergestellt. Ein zweiter Gegenstand wurde ebenfalls hergestellt, wobei eine Glutaraldehyd/HCl-Exposition von nur 5 Minuten verwendet wurde. Beide Gegenstände wurden dampfsterilisiert und unter Verwendung von FTIR untersucht. Der gemäß Beispiel 6

5 hergestellte Gegenstand offenbarte einen breiten Peak bei etwa  $1690\text{ cm}^{-1}$  und einem scharfen Peak bei etwa  $1590\text{ cm}^{-1}$ . Man geht davon aus, dass diese Peaks für auf der ersten Schicht vorhandene überschüssige Aldehyd-Gruppen und ihre partiellen Hydrolyse-Produkte aus der Dampf-Exposition stehen. Der Gegenstand, der 5 Minuten lang Glutaraldehyd/HCl ausgesetzt

10 war, zeigte einen kleinen Peak bei etwa  $1690\text{ cm}^{-1}$  und keinen Peak bei etwa  $1590\text{ cm}^{-1}$ . Diese Ergebnisse zeigen, dass die PVA-Schicht des zweiten Gegenstands in einem geringeren Ausmaß als die PVA-Schicht des ersten Gegenstands vernetzt war. Dementsprechend ist eine Erhöhung der Peak-Flächen bei etwa  $1690\text{ cm}^{-1}$  und  $1590\text{ cm}^{-1}$  ein Anzeichen für das Ausmaß der

15 Vernetzung der ersten Schicht eines Gegenstands der vorliegenden Erfindung.

#### Beispiel 44

20 Dieses Beispiel veranschaulicht ein Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit einer an eine erste Schicht aus PVA gebundenen zweiten Schicht aus PVA bei einem Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Bei dem Verfahren wurde ein gemäß Beispiel 10 hergestellter Gegenstand dampfsterilisiert und unter Verwendung von FTIR untersucht. Bei der FTIR-Analyse waren starke

25 Peaks bei etwa  $2950\text{ cm}^{-1}$  und etwa  $3350\text{ cm}^{-1}$  zu sehen. Diese Peaks stehen für Signale von dem Kohlenwasserstoff-Rückgrat bzw. den Hydroxylgruppen des PVA der ersten und zweiten Schicht. Peaks bei  $1590\text{ cm}^{-1}$  und  $1690\text{ cm}^{-1}$  waren nicht zu sehen. Das Fehlen von Peaks bei  $1590\text{ cm}^{-1}$  und  $1690\text{ cm}^{-1}$  ist ein Hinweis, dass im Wesentlichen alle Aldehyd-Gruppen des

30 Vernetzungsmittels während der Bindung der zweiten Schicht an die erste Schicht verbraucht wurden. Dementsprechend ist das Verhältnis der Peakfläche bei etwa  $2950\text{ cm}^{-1}$  zu der Peakfläche bei etwa  $1590\text{ cm}^{-1}$  ein Hinweis auf das Ausmaß, in dem überschüssige unumgesetzte Aldehyd-Gruppen

nach der Bindung einer zweiten Schicht an eine erste Schicht bei der vorliegenden Erfindung anwesend sind.

#### Beispiel 45

5 Dieses Beispiel veranschaulicht ein Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit einer an eine erste Schicht aus PVA gebundenen zweiten Schicht, bestehend aus Poly(lysin). Bei dem Verfahren wurde ein gemäß Beispiel 12 hergestellter Gegenstand dampfsterilisiert und unter Verwendung von FTIR untersucht. Bei FTIR-Analyse war ein starker Peak bei etwa  $2950\text{ cm}^{-1}$  zu sehen. Dieser Peak steht für ein Signal des Kohlenwasserstoff-Rückgrats von PVA der ersten Schicht. Ein Peak bei etwa  $1590\text{ cm}^{-1}$  wurde nicht beobachtet. Das Fehlen eines Peaks bei  $1590\text{ cm}^{-1}$  ist ein Hinweis darauf, dass im Wesentlichen alle Aldehyd-Gruppen des Vernetzungsmittels der ersten Schicht während der Bindung der zweiten Schicht an die erste Schicht verbraucht wurden. Es wurde ein Peak bei etwa  $1650\text{ cm}^{-1}$  beobachtet. Dieser Peak steht für ein Signal von den Amid-Gruppen der Poly(lysin)-Baueinheiten der zweiten Schicht. Wie in Beispiel 44 ist das Verhältnis der Peak-Fläche bei etwa  $2950\text{ cm}^{-1}$  zu der Peak-Fläche bei etwa  $1590\text{ cm}^{-1}$  ein Hinweis für das Ausmaß, in dem überschüssige, unumgesetzte Aldehyd-Gruppen nach der Bindung einer zweiten Schicht an eine erste Schicht bei der vorliegenden Erfindung anwesend sind.

#### Beispiel 46

25 Dieses Beispiel veranschaulicht die Immobilisierung von Lysin an eine zweite Schicht, die aus PVA besteht, dergestalt, dass die Lysin-Moleküle über die  $\alpha$ -Amin-Gruppe des Moleküls immobilisiert werden, während die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle unumgesetzt bleibt. Dieses Verfahren beruht auf Boc-Schutz der  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle.

Eine Konstruktion der vorliegenden Erfindung mit einer zweiten Schicht gemäß Beispiel 10 wird 60 Minuten lang in eine 5 %-ige Lösung von Car-



5 bonyldiimidazol, gelöst in wasserfreiem Aceton eingetaucht. Die Konstruktion wird nacheinander in Aceton, dann in wässrigem Puffer (150 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 500 mM NaCl, pH 8,0, 4°C) gespült. N- $\epsilon$ -Boc-L-Lysin (Bachem California, Torrance CA) wird in dem Kopplungspuffer in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Die Anordnung wird 24 Stunden lang bei 4°C unter leichter Bewegung in diese Lösung eingetaucht.

10 Die Konstruktion wird nacheinander in Kopplungspuffer, deionisiertem Wasser und Tetrahydrofuran gespült. Die Konstruktion wird dann 60 Minuten lang in eine Lösung von 10 % Trifluoressigsäure, gelöst in Tetrahydrofuran, eingetaucht. Dem folgt nacheinander Spülen in Tetrahydrofuran, deionisiertem Wasser und Kopplungspuffer. Der sich ergebende Gegenstand enthält ausschließlich über das  $\alpha$ -Amin-Ende an der zweiten Schicht immobilisiertes Lysin, wobei die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe des Lysins unumgesetzt oder frei bleibt.

15

#### Beispiel 47

20 Dieses Beispiel veranschaulicht eine andere Immobilisierung von Lysin an eine zweite Schicht, bestehend aus PVA, dergestalt, dass die Lysin-Moleküle über die  $\alpha$ -Amin-Gruppe des Moleküls immobilisiert werden, während die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle unumgesetzt bleiben. Dieses Verfahren beruht auf Boc-Schutz der  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle.

25 Eine Konstruktion der vorliegenden Erfindung mit einer zweiten Schicht gemäß Beispiel 10 wird 60 Minuten lang in eine 5 %-ige Lösung von Carbonyldiimidazol, gelöst in wasserfreiem Dimethylformamid, eingetaucht. Die Konstruktion wird in Dimethylformamid gespült. N- $\epsilon$ -Boc-L-Lysin (Bachem California, Torrance CA) wird in Dimethylformamid in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Die Konstruktion wird unter leichter Bewegung

30 24 Stunden lang bei 4°C in diese Lösung eingetaucht. Die Konstruktion wird dann in Dimethylformamid gespült. Als nächstes wird die Probe 60 Minuten lang in eine Lösung von 10 % Trifluoressigsäure, gelöst in Di-

methyformamid, eingetaucht, gefolgt von aufeinander folgendem Spülen in Dimethylformamid, deionisiertem Wasser und phosphatgepufferter Kochsalzlösung. Der sich ergebende Gegenstand enthält Lysin, das ausschließlich über das  $\alpha$ -Amin-Ende an der zweiten Schicht immobilisiert ist, wobei die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe des Lysins unumgesetzt oder frei bleibt.

#### Beispiel 48

Dieses Beispiel veranschaulicht eine andere Immobilisierung von Lysin an eine zweite Schicht, bestehend aus PVA, dergestalt, dass die Lysin-Moleküle über die  $\alpha$ -Amin-Gruppe des Moleküls immobilisiert werden, während die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle unumgesetzt bleiben. Dieses Verfahren beruht auf Fmoc-Schutz der  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle.

Eine Konstruktion der vorliegenden Erfindung mit einer zweiten Schicht gemäß Beispiel 10 wird 60 Minuten lang in eine 5 %-ige Lösung von Carbonyldiimidazol, gelöst in wasserfreiem Aceton, eingetaucht. Die Konstruktion wird nacheinander in Aceton, dann wässrigem Puffer (150 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 500 mM  $\text{NaCl}$ , pH 8,0, 4°C) gespült. N- $\epsilon$ -Fmoc-L-Lysin (Bachem California, Torrance CA) wird in dem Kopplungspuffer in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Die Anordnung wird 24 Stunden lang bei 4°C unter leichter Bewegung in diese Lösung eingetaucht.

Die Konstruktion wird nacheinander in Kopplungspuffer, deionisiertem Wasser und Tetrahydrofuran gespült. Die Konstruktion wird dann 60 Minuten lang in eine Lösung von 10 % Piperidin, gelöst in Tetrahydrofuran, eingetaucht. Dem folgt aufeinander folgendes Spülen in Tetrahydrofuran, deionisiertem Wasser und Kopplungspuffer. Der sich ergebende Gegenstand enthält Lysin, das ausschließlich über das  $\alpha$ -Amin-Ende an der zweiten Schicht immobilisiert ist, wobei die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe des Lysins unumgesetzt oder frei bleibt.

## Beispiel 49

5 Dieses Beispiel veranschaulicht eine andere Immobilisierung von Lysin an eine zweite Schicht, bestehend aus PVA, dergestalt, dass die Lysin-Moleküle über die  $\alpha$ -Amin-Gruppe des Moleküls immobilisiert werden, während die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle unumgesetzt bleibt. Dieses Verfahren beruht auf Fmoc-Schutz der  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle.

10 Eine Konstruktion der vorliegenden Erfindung mit einer zweiten Schicht gemäß Beispiel 10 wird 60 Minuten lang in eine 5 %-ige Lösung von Carbonyldiimidazol, gelöst in wasserfreiem Dimethylformamid, eingetaucht. Die Konstruktion wird in Dimethylformamid gespült. N- $\epsilon$ -Fmoc-L-Lysin (Bachem California, Torrance CA) wird in Dimethylformamid in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Die Konstruktion wird unter leichter Bewe-

15 gung 24 Stunden lang bei 4°C in diese Lösung eingetaucht. Die Konstruktion wird dann in Dimethylformamid gespült. Als nächstes wird die Probe 60 Minuten lang in eine Lösung von 10 % Trifluoressigsäure, gelöst in Dimethylformamid, eingetaucht, gefolgt von aufeinander folgendem Spülen in Dimethylformamid, deionisiertem Wasser und phosphatgepufferter Koch-

20 salzlösung. Der sich ergebende Gegenstand enthält Lysin, das ausschließlich über das  $\alpha$ -Amin-Ende an der zweiten Schicht immobilisiert ist, wobei die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe des Lysins unumgesetzt oder frei bleibt.

## Beispiel 50

25 Dieses Beispiel veranschaulicht die Immobilisierung von Lysin an eine zweite Schicht, bestehend aus Poly(ethylenimin), dergestalt, dass die Lysin-Moleküle über die  $\alpha$ -Amin-Gruppe des Moleküls immobilisiert werden, während die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle unumgesetzt bleibt. Dieses

30 Verfahren beruht auf Boc-Schutz der  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle.

Eine Konstruktion der vorliegenden Erfindung mit einer zweiten Schicht, bestehend aus Poly(ethylenimin), wird 60 Minuten lang in eine 5 %-ige Lö-

sung von Carbonyldiimidazol, gelöst in wasserfreiem Aceton, eingetaucht. Die Konstruktion wird nacheinander in Aceton, dann wässrigem Puffer (150 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 500 mM NaCl, pH 8,0, 4°C) gespült. N- $\epsilon$ -Boc-L-Lysin (Bachem California, Torrance CA) wird in dem Kopplungspuffer in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Die Anordnung wird 24 Stunden lang bei 4°C unter leichter Bewegung in diese Lösung eingetaucht.

Die Konstruktion wird nacheinander in Kopplungspuffer, deionisiertem Wasser und Tetrahydrofuran gespült. Die Konstruktion wird dann 60 Minuten lang in eine Lösung von 10 % Trifluoressigsäure, gelöst in Tetrahydrofuran, eingetaucht. Dem folgt aufeinander folgendes Spülen in Tetrahydrofuran, deionisiertem Wasser und Kopplungspuffer. Der sich ergebende Gegenstand enthält Lysin, das ausschließlich über das  $\alpha$ -Amin-Ende an der zweiten Schicht immobilisiert ist, wobei die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe des Lysins unumgesetzt oder frei bleibt.

#### Beispiel 51

Dieses Beispiel veranschaulicht eine andere Immobilisierung von Lysin an eine zweite Schicht, bestehend aus Poly(ethylenimin), dergestalt, dass die Lysin-Moleküle über die  $\alpha$ -Amin-Gruppe des Moleküls immobilisiert werden, während die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle unumgesetzt bleibt. Dieses Verfahren beruht auf Boc-Schutz der  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle.

Eine Konstruktion der vorliegenden Erfindung mit einer zweiten Schicht, bestehend aus Poly(ethylenimin), wird 60 Minuten lang in eine 5 %-ige Lösung von Carbonyldiimidazol, gelöst in wasserfreiem Dimethylformamid, eingetaucht. Die Konstruktion wird in Dimethylformamid gespült. N- $\epsilon$ -Boc-L-Lysin (Bachem California, Torrance CA) wird in Dimethylformamid in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Die Konstruktion wird unter leichter Bewegung 24 Stunden lang bei 4°C in diese Lösung eingetaucht. Die Konstruktion wird dann in Dimethylformamid gespült. Als nächstes

5 wird die Probe 60 Minuten lang in eine Lösung von 10 % Trifluoressigsäure, gelöst in Dimethylformamid, eingetaucht, gefolgt von aufeinander folgendem Spülen in Dimethylformamid, deionisiertem Wasser und phosphat-gepufferter Kochsalzlösung. Der sich ergebende Gegenstand enthält Lysin, das ausschließlich über das  $\alpha$ -Amin-Ende an der zweiten Schicht immobili-siert ist, wobei die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe des Lysins unumgesetzt oder frei bleibt.

#### Beispiel 52

10 Dieses Beispiel veranschaulicht eine andere Immobilisierung von Lysin an eine zweite Schicht, bestehend aus Poly(ethylenimin), dergestalt, dass die Lysin-Moleküle über die  $\alpha$ -Amin-Gruppe des Moleküls immobilisiert wer-den, während die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle unumgesetzt bleibt. Dieses Verfahren beruht auf Fmoc-Schutz der  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle.

15 Eine Konstruktion der vorliegenden Erfindung mit einer zweiten Schicht, bestehend aus Poly(ethylenimin), wird 60 Minuten lang in eine 5 %-ige Lö-sung von Carbonyldiimidazol, gelöst in wasserfreiem Aceton, eingetaucht. 20 Die Konstruktion wird nacheinander in Aceton, dann wässrigem Puffer (150 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 500 mM  $\text{NaCl}$ , pH 8,0, 4°C) gespült. N- $\epsilon$ -Fmoc-L-Lysin (Bachem California, Torrance CA) wird in dem Kopplungspuffer in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Die Anordnung wird 24 Stunden lang bei 4°C unter leichter Bewegung in diese Lösung eingetaucht.

25 Die Konstruktion wird nacheinander in Kopplungspuffer, deionisiertem Wasser und Tetrahydrofuran gespült. Die Konstruktion wird dann 60 Minu-ten lang in eine Lösung von 10 % Piperidin, gelöst in Tetrahydrofuran, ein-getaucht. Dem folgt aufeinander folgendes Spülen in Tetrahydrofuran, deio-nisiertem Wasser und Kopplungspuffer. Der sich ergebende Gegenstand 30 enthält Lysin, das ausschließlich über das  $\alpha$ -Amin-Ende an der zweiten Schicht immobilisiert ist, wobei die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe des Lysins unumgesetzt oder frei bleibt.

## Beispiel 53

5 Dieses Beispiel veranschaulicht eine andere Immobilisierung von Lysin an eine zweite Schicht, bestehend aus Poly(ethylenimin), dergestalt, dass die Lysin-Moleküle über die  $\alpha$ -Amin-Gruppe des Moleküls immobilisiert werden, während die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle unumgesetzt bleibt. Dieses Verfahren beruht auf Fmoc-Schutz der  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle.

10 Eine Konstruktion der vorliegenden Erfindung mit einer zweiten Schicht, bestehend aus Poly(ethylenimin), wird 60 Minuten lang in eine 5 %-ige Lösung von Carbonyldiimidazol, gelöst in wasserfreiem Dimethylformamid, eingetaucht. Die Konstruktion wird in Dimethylformamid gespült. N- $\epsilon$ -Fmoc-L-Lysin (Bachem California, Torrance CA) wird in Dimethylformamid in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Die Konstruktion wird unter leichter Bewegung 24 Stunden lang bei 4°C in diese Lösung eingetaucht. Die Konstruktion wird dann in Dimethylformamid gespült. Als nächstes wird die Probe 60 Minuten lang in eine Lösung von 10 % Trifluoressigsäure, gelöst in Dimethylformamid, eingetaucht, gefolgt von aufeinanderfolgendem Spülen in Dimethylformamid, deionisiertem Wasser und phosphatgepufferter Kochsalzlösung. Der sich ergebende Gegenstand enthält Lysin, das ausschließlich über das  $\alpha$ -Amin-Ende an der zweiten Schicht immobilisiert ist, wobei die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe des Lysins unumgesetzt oder frei bleibt.

## Beispiel 54

30 Dieses Beispiel veranschaulicht die Immobilisierung von Lysin an eine zweite Schicht, bestehend aus Poly(l-lysin), dergestalt, dass die Lysin-Moleküle über die  $\alpha$ -Amin-Gruppe des Moleküls immobilisiert werden, während die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle unumgesetzt bleibt. Dieses Verfahren beruht auf Boc-Schutz der  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle.

Eine Konstruktion der vorliegenden Erfindung mit einer zweiten Schicht gemäß Beispiel 12 wird 60 Minuten lang in eine 5 %-ige Lösung von Carbonyldiimidazol, gelöst in wasserfreiem Aceton, eingetaucht. Die Konstruktion wird nacheinander in Aceton, dann wässrigem Puffer (150 mM NaHCO<sub>3</sub>, 500 mM NaCl, pH 8,0, 4°C) gespült. N-ε-Boc-L-Lysin (Bachem California, Torrance CA) wird in dem Kopplungspuffer in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Die Anordnung wird 24 Stunden lang bei 4°C unter leichter Bewegung in diese Lösung eingetaucht.

Die Konstruktion wird nacheinander in Kopplungspuffer, deionisiertem Wasser und Tetrahydrofuran gespült. Die Konstruktion wird dann 60 Minuten lang in eine Lösung von 10 % Trifluoressigsäure, gelöst in Tetrahydrofuran, eingetaucht. Dem folgt aufeinander folgendes Spülen in Tetrahydrofuran, deionisiertem Wasser und Kopplungspuffer. Der sich ergebende Gegenstand enthält Lysin, das ausschließlich über das α-Amin-Ende an der zweiten Schicht immobilisiert ist, wobei die ε-Amin-Gruppe des Lysins unumgesetzt oder frei bleibt.

#### Beispiel 55

Dieses Beispiel veranschaulicht eine andere Immobilisierung von Lysin an eine zweite Schicht, bestehend aus Poly(l-lysin), dergestalt, dass die Lysin-Moleküle über die α-Amin-Gruppe des Moleküls immobilisiert werden, während die ε-Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle unumgesetzt bleibt. Dieses Verfahren beruht auf Boc-Schutz der ε-Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle.

Eine Konstruktion der vorliegenden Erfindung mit einer zweiten Schicht gemäß Beispiel 12 wird 60 Minuten lang in eine 5 %-ige Lösung von Carbonyldiimidazol, gelöst in wasserfreiem Dimethylformamid, eingetaucht. Die Konstruktion wird in Dimethylformamid gespült. N-ε-Boc-L-Lysin (Bachem California, Torrance CA) wird in Dimethylformamid in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Die Konstruktion wird unter leichter Bewegung

24 Stunden lang bei 4°C in diese Lösung eingetaucht. Die Konstruktion wird dann in Dimethylformamid gespült. Als nächstes wird die Probe 60 Minuten lang in eine Lösung von 10 % Trifluoressigsäure, gelöst in Dimethylformamid, eingetaucht, gefolgt von aufeinander folgendem Spülen in Dimethylformamid, deionisiertem Wasser und phosphatgepufferter Kochsalzlösung. Der sich ergebende Gegenstand enthält Lysin, das ausschließlich über das  $\alpha$ -Amin-Ende an der zweiten Schicht immobilisiert ist, wobei die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe des Lysins unumgesetzt oder frei bleibt.

#### Beispiel 56

Dieses Beispiel veranschaulicht eine andere Immobilisierung von Lysin an eine zweite Schicht, bestehend aus Poly(l-lysin), dergestalt, dass die Lysin-Moleküle über die  $\alpha$ -Amin-Gruppe des Moleküls immobilisiert werden, während die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle unumgesetzt bleibt. Dieses Verfahren beruht auf Fmoc-Schutz der  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle.

Eine Konstruktion der vorliegenden Erfindung mit einer zweiten Schicht gemäß Beispiel 12 wird 60 Minuten lang in eine 5 %-ige Lösung von Carboxyldiimidazol, gelöst in wasserfreiem Aceton, eingetaucht. Die Konstruktion wird nacheinander in Aceton, dann wässrigem Puffer (150 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 500 mM  $\text{NaCl}$ , pH 8,0, 4°C) gespült. N- $\epsilon$ -Fmoc-L-Lysin (Bachem California, Torrance CA) wird in dem Kopplungspuffer in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Die Anordnung wird 24 Stunden lang bei 4°C unter leichter Bewegung in diese Lösung eingetaucht.

Die Konstruktion wird nacheinander in Kopplungspuffer, deionisiertem Wasser und Tetrahydrofuran gespült. Die Konstruktion wird dann 60 Minuten lang in eine Lösung von 10 % Piperidin, gelöst in Tetrahydrofuran, eingetaucht. Dem folgt aufeinander folgendes Spülen in Tetrahydrofuran, deionisiertem Wasser und Kopplungspuffer. Der sich ergebende Gegenstand enthält Lysin, das ausschließlich über das  $\alpha$ -Amin-Ende an der zweiten



Schicht immobilisiert ist, wobei die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe des Lysins unumgesetzt oder frei bleibt.

#### Beispiel 57

5

10

Dieses Beispiel veranschaulicht eine andere Immobilisierung von Lysin an eine zweite Schicht, bestehend aus Poly(l-lysin), dergestalt, dass die Lysin-Moleküle über die  $\alpha$ -Amin-Gruppe des Moleküls immobilisiert werden, während die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle unumgesetzt bleibt. Dieses Verfahren beruht auf FMOC-Schutz der  $\epsilon$ -Amin-Gruppe der Lysin-Moleküle.

15

20

25

Eine Konstruktion der vorliegenden Erfindung mit einer zweiten Schicht gemäß Beispiel 12 wird 60 Minuten lang in eine 5 %-ige Lösung von Carbonyldiimidazol, gelöst in wasserfreiem Dimethylformamid, eingetaucht. Die Konstruktion wird in Dimethylformamid gespült. N- $\epsilon$ -FMOC-L-Lysin (Bachem California, Torrance CA) wird in Dimethylformamid in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Die Konstruktion wird unter leichter Bewegung 24 Stunden lang bei 4°C in diese Lösung eingetaucht. Die Konstruktion wird dann in Dimethylformamid gespült. Als nächstes wird die Probe 60 Minuten lang in eine Lösung von 10 % Trifluoressigsäure, gelöst in Dimethylformamid, eingetaucht, gefolgt von aufeinander folgendem Spülen in Dimethylformamid, deionisiertem Wasser und phosphatgepufferter Kochsalzlösung. Der sich ergebende Gegenstand enthält Lysin, das ausschließlich über das  $\alpha$ -Amin-Ende an der zweiten Schicht immobilisiert ist, wobei die  $\epsilon$ -Amin-Gruppe des Lysins unumgesetzt oder frei bleibt.

#### Beispiel 58

30

Dieses Beispiel veranschaulicht ein Gefäßtransplantat, das mit Materialien der vorliegenden Erfindung hergestellt ist. Ein aus einem porösen Polytetrafluorethylen-Material (W. L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ.) bestehendes Gefäßtransplantat wird erhalten und den in den obigen Beispielen 1

und 9 beschriebenen Verfahren unterzogen, um das Transplantat für die Immobilisierung von Lysin daran vorzubereiten.

5

Lysin wird mittels irgendeines der Verfahren, die in den obigen Beispielen 46 - 57 beschrieben sind, an die zweite Schicht gebunden. An dem sich ergebenden Gefäßtransplantat ist Lysin dergestalt immobilisiert, dass zirkulierendes Plasminogen an das immobilisierte Lysin binden und darauf eine thrombolytische Blut-Kontaktfläche bilden kann, wenn das Transplantat in einen Empfänger implantiert wird.

10

EP 97 927 968.4

K 52 348/7

## 5 Patentansprüche

1. Material mit immobilisierten bioaktiven Spezies, aufweisend:  
einen Trägerbestandteil,  
eine erste Schicht, bestehend aus mindestens einer Art eines polymeren  
10 oberflächenaktiven Mittels, das an den Trägerbestandteil gebunden und  
mit sich in situ vernetzt ist,  
eine zweite Schicht, bestehend aus mindestens einer Art eines hydrophi-  
len Polymers, das an die erste Schicht gebunden ist, und  
mindestens eine Art von bioaktiver Spezies, die an die zweite Schicht  
15 gebunden ist.
2. Material nach Anspruch 1, bei dem der Trägerbestandteil ein nicht-  
poröses Polymermaterial aufweist.
- 20 3. Material nach Anspruch 2, bei dem das nicht-poröse Polymermaterial  
ausgewählt ist aus einem Glied der Gruppe, die besteht aus Polytetra-  
fluorethylen, Polyethylen, Polypropylen, Polyethylenterephthalat, Poly-  
styrol, Polysulfon, Polycarbonat, Polyethylen-co-vinylacetat, Polyamid,  
Polyurethan und regenerierter Cellulose.
- 25 4. Material nach Anspruch 1, bei dem der Trägerbestandteil ausgewählt  
ist aus einem Glied der Gruppe, die besteht aus Seide, Wolle und Leder.
5. Material nach Anspruch 1, bei dem der Trägerbestandteil ein poröses  
30 Polymermaterial aufweist.

6. Material nach Anspruch 5, bei dem das poröse Polymermaterial ausgewählt ist aus einem Glied der Gruppe, die besteht aus porösem Polytetrafluorethylen, porösem Polyethylen, porösem Polypropylen, porösem Polyethylenterephthalat, porösem Polyurethan, porösem Siliconkautschuk, porösem Polystyrol, porösem Polysulfon, porösem Polyester, porösen Polyhydroxysäuren, porösem Polycarbonat, porösem Polyimid, porösem Polyamid, porösen Polyaminosäuren und poröser regenerierter Cellulose.

7. Material nach Anspruch 1, bei dem das polymere oberflächenaktive Mittel ein multifunktionelles Copolymer aufweist, das besteht aus mindestens einem Bereich mit physikalisch-chemischer Affinität zu dem Trägerbestandteil und mindestens einem Bereich, der mit einem Vernetzungsmittel chemisch reaktionsfähig ist.

8. Material nach Anspruch 1, bei dem das hydrophile Polymer chemisch funktionelle Gruppen aufweist, die zur Bindung an die erste Schicht fähig sind, und zusätzlich chemisch funktionelle Gruppen, die zur Bindung an die bioaktive Spezies fähig sind.

9. Material nach Anspruch 1, bei dem das polymere oberflächenaktive Mittel der ersten Schicht ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Polyvinylalkohol, Polyethylenglycol, Polypropylenglycol, Dextran, Agarose, Alginat, Polyacrylamid, Polyglycidol, Poly(vinylalkohol-co-ethylen), Poly(ethylenglycol-co-propylenglycol), Poly(vinylacetat-co-vinylalkohol), Poly(tetrafluorethylen-co-vinylalkohol), Poly(acrylnitril-co-acrylamid), Poly(acrylnitril-co-acrylsäure-co-acrylamidin), Polyacrylsäure, Polylysin, Polyethylenimin, Polyvinylpyrrolidon, Polyhydroxyethyl-

methacrylat und Polysulfon und ihren Copolymeren, entweder alleine oder in Kombination.

5 10. Material nach Anspruch 1, bei dem das hydrophile Polymer der zweiten Schicht ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Polyvinylalkohol, Polylysin, Poly(acrylnitril-co-acrylsäure-acrylamidin), Polyacrylsäure, Polyhydroxyethylmethacrylat, Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenglycol, Alginat, Sepharose, Agarose, Polyethylenimin, Polyallylamin, Polyaminoethylmethacrylat, Polyornithin, Polyaminoacrylamid, Polyacrylamid, Polyacrolein, Polyacryloxysuccinimid, Polysulfon, Poly(acrylnitril-co-acrylamid) und ihren Copolymeren, entweder alleine oder in Kombination.

15 11. Material nach Anspruch 1, bei dem das hydrophile Polymer ein statistisches Copolymer aus Tetrafluorethylen und Vinylalkohol aufweist.

12. Material nach Anspruch 1, bei dem das hydrophile Polymer ein Copolymer aus Hydroxyethylmethacrylat und Hexafluoracrylat aufweist.

20 13. Material nach Anspruch 1, bei dem das hydrophile Polymer ein Copolymer aus Polyethylen und Vinylalkohol aufweist.

14. Material nach Anspruch 1, bei dem eine Abstandhalter-Verbindung zwischen die zweite Schicht und die bioaktive Spezies eingeschoben ist.

25 15. Material nach Anspruch 14, bei dem die Abstandhalter-Verbindung ausgewählt ist aus einem Glied einer Gruppe, die besteht aus Succinsäure, Diaminohexan, Glyoxylsäure, kurzkettigem Polyethylenglycol und Glycin.

16. Material nach Anspruch 14, bei dem die Abstandhalter-Verbindung spaltbar ist.

5 17. Material nach Anspruch 16, bei dem die spaltbare Abstandhalter-Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Polyhydroxysäuren, Polyanhydriden, Polyaminosäuren, Tartraten und Cystein-Linkern.

10 18. Material mit immobilisierten bioaktiven Spezies, aufweisend:  
einen Trägerbestandteil, bestehend aus einem Polytetrafluorethylen-Material,  
eine erste Schicht, bestehend aus mindestens einer Art eines polymeren oberflächenaktiven Mittels, das an den Trägerbestandteil gebunden ist  
und mit sich in situ mit ausreichenden Mengen eines Vernetzungsmittels  
15 vernetzt ist, so daß unumgesetzte chemisch reaktive Gruppen des Vernetzungsmittels vorhanden sind,  
eine zweite Schicht, bestehend aus mindestens einer Art eines hydrophilen Polymers, das über die unumgesetzten chemisch reaktiven Gruppen des Vernetzungsmittels an die erste Schicht gebunden ist, und  
20 mindestens eine Art von bioaktiver Spezies, die an die zweite Schicht gebunden ist.

25 19. Material nach Anspruch 18, bei dem das polymere oberflächenaktive Mittel ein multifunktionelles Copolymer aufweist, das besteht aus mindestens einem Bereich mit physikalisch-chemischer Affinität zu dem Trägerbestandteil und mindestens einem Bereich, der mit dem Vernetzungsmittel chemisch reaktionsfähig ist.

20. Material nach Anspruch 18, bei dem das hydrophile Polymer chemisch funktionelle Gruppen aufweist, die zur Bindung an die unumgesetzten chemisch reaktiven Gruppen des an die erste Schicht gebundenen Vernetzungsmittels fähig sind, und das zusätzlich chemisch funktionelle Gruppen hat, die zur Bindung an die bioaktive Spezies fähig sind.
21. Material nach Anspruch 18, bei dem das Polytetrafluorethylen-Material porös ist.
22. Material nach Anspruch 18, bei dem das Polytetrafluorethylen-Material nicht porös ist.
23. Material nach Anspruch 18, bei dem eine Abstandhalter-Verbindung zwischen die zweite Schicht und die bioaktive Spezies eingeschoben ist.
24. Material nach Anspruch 23, bei dem die Abstandhalter-Verbindung ausgewählt ist aus einem Glied der Gruppe, die besteht aus Succinsäure, Diaminohexan, Glyoxylsäure, kurzkettigem Polyethylenglycol und Glycin.
25. Material nach Anspruch 23, bei dem die Abstandhalter-Verbindung spaltbar ist.
26. Material nach Anspruch 25, bei dem die spaltbare Abstandhalter-Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Polyhydroxysäuren, Polyanhydriden, Polyaminosäuren, Tartraten und Cystein-Linkern.
27. Material mit immobilisierten bioaktiven Spezies, aufweisend:

einen Trägerbestandteil,

eine erste Schicht, bestehend aus mindestens einer Art eines polymeren oberflächenaktiven Mittels, das an den Trägerbestandteil gebunden ist und mit sich in situ mit ausreichenden Mengen eines Vernetzungsmittels vernetzt ist, so daß unumgesetzte chemisch reaktionsfähige Gruppen des Vernetzungsmittels vorhanden sind,

eine zweite Schicht, bestehend aus mindestens einer Art eines hydrophilen Polymers, das über die unumgesetzten chemisch reaktiven Gruppen des Vernetzungsmittels an die erste Schicht gebunden ist, und mindestens eine Art von bioaktiver Spezies, die an die zweite Schicht gebunden ist.

28. Material nach Anspruch 27, bei dem der Trägerbestandteil ein nicht-poröses Polymermaterial aufweist.

29. Material nach Anspruch 28, bei dem das nicht-poröse Polymermaterial ausgewählt ist aus einem Glied der Gruppe, die besteht aus Polytetrafluorethylen, Polyethylen, Polypropylen, Polyethylenterephthalat, Polystyrol, Polysulfon, Polycarbonat und regenerierter Cellulose.

30. Material nach Anspruch 27, bei dem der Trägerbestandteil ein poröses Polymermaterial aufweist.

31. Material nach Anspruch 30, bei dem das poröse Polymermaterial ausgewählt ist aus einem Glied der Gruppe, die besteht aus porösem Polytetrafluorethylen, porösem Polyethylen, porösem Polypropylen, porösem Polyethylenterephthalat, porösem Polyurethan, porösem Silikonkautschuk, porösem Polystyrol, porösem Polysulfon, porösem Polyester, porösen Polyhydroxysäuren, porösem Polycarbonat, porösem Polyimid,



porösem Polyamid, porösen Polyaminosäuren und poröser regenerierter Cellulose.

5 32. Material nach Anspruch 27, bei dem das polymere oberflächenaktive Mittel ein multifunktionelles Copolymer aufweist, das besteht aus mindestens einem Bereich mit physikalisch-chemischer Affinität zu dem Trägerbestandteil und mindestens einem Bereich, der mit dem Vernetzungsmittel chemisch reaktionsfähig ist.

10 33. Material nach Anspruch 27, bei dem das hydrophile Polymer chemisch funktionelle Gruppen aufweist, die zur Bindung an die unumgesetzten chemisch reaktionsfähigen Gruppen des an die erste Schicht gebundenen Vernetzungsmittels fähig sind, und zusätzlich chemisch funktionelle Gruppen hat, die zur Bindung an die bioaktive Spezies fähig sind.

15 34. Material nach Anspruch 27, bei dem eine Abstandhalter-Verbindung zwischen die zweite Schicht und die bioaktive Spezies eingeschoben ist.

20 35. Material nach Anspruch 34, bei dem die Abstandhalter-Verbindung ausgewählt ist aus einem Glied einer Gruppe, die besteht aus Succinsäure, Diaminohexan, Glyoxylsäure, kurzkettigem Polyethylenglycol und Glycin.

25 36. Material nach Anspruch 34, bei dem die Abstandhalter-Verbindung spaltbar ist.

37. Material nach Anspruch 36, bei dem die spaltbare Abstandhalter-Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Polyhydroxy-

säuren, Polyanhydriden, Polyaminosäuren, Tartraten und Cystein-Lin-  
kern.

38. Material mit immobilisierten bioaktiven Spezies, aufweisend:

5

einen Trägerbestandteil,

eine erste Schicht, bestehend aus mindestens einer Art eines polymeren  
oberflächenaktiven Mittels, das an den Trägerbestandteil gebunden ist  
und mit sich in situ mit ausreichenden Mengen eines Vernetzungsmittels  
vernetzt ist, so daß unumgesetzte chemisch reaktionsfähige Gruppen des  
Vernetzungsmittels vorhanden sind, und mindestens eine Art von bio-  
aktiver Spezies, die an die erste Schicht gebunden ist.

10

39. Material nach Anspruch 38, bei dem der Trägerbestandteil ein nicht-  
poröses Polymermaterial aufweist.

15

40. Material nach Anspruch 39, bei dem das nicht-poröse Polymermate-  
rial ausgewählt ist aus einem Glied der Gruppe, die besteht aus Polyte-  
trafluorethylen, Polyethylen, Polypropylen, Polyethylenterephthalat,  
Polystyrol, Polysulfon, Polycarbonat und regenerierter Cellulose.

20

41. Material nach Anspruch 38, bei dem der Trägerbestandteil ein porö-  
ses Polymermaterial aufweist.

25

42. Material nach Anspruch 41, bei dem das poröse Polymermaterial  
ausgewählt ist aus einem Glied der Gruppe, die besteht aus porösem  
Polytetrafluorethylen, porösem Polyethylen, porösem Polypropylen,  
porösem Polyethylenterephthalat, porösem Polyurethan, porösem Silicon-  
kautschuk, porösem Polystyrol, porösem Polysulfon, porösem Polyester,  
porösen Polyhydroxysäuren, porösem Polycarbonat, porösem Polyimid,

porösem Polyamid, porösen Polyaminosäuren und poröser regenerierter Cellulose.

5 43. Material nach Anspruch 38, bei dem das polymere oberflächenaktive Mittel ein multifunktionelles Copolymer aufweist, das besteht aus mindestens einem Bereich mit physikalisch-chemischer Affinität zu dem Trägerbestandteil und mindestens einem Bereich, der mit dem Vernetzungsmittel chemisch reaktionsfähig ist.

10 44. Material nach Anspruch 38, bei dem eine Abstandhalter-Verbindung zwischen der ersten Schicht und der bioaktiven Spezies eingeschoben ist.

15 45. Material nach Anspruch 44, bei dem die Abstandhalter-Verbindung ausgewählt ist aus einem Glied einer Gruppe, die besteht aus Succinsäure, Diaminohexan, Glyoxylsäure, kurzkettigem Polyethylenglycol und Glycin.

20 46. Material nach Anspruch 44, bei dem die Abstandhalter-Verbindung spaltbar ist.

25 47. Material nach Anspruch 46, bei dem die spaltbare Abstandhalter-Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Polyhydroxysäuren, Polyanhydriden, Polyaminosäuren, Tartraten und Cystein-Linkern.

48. Material mit immobilisierten bioaktiven Spezies, aufweisend:  
einen Trägerbestandteil,

eine erste Schicht, bestehend aus mindestens einer Art eines polymeren oberflächenaktiven Mittels, das an den Trägerbestandteil gebunden ist und mit sich in situ vernetzt ist,

5 eine Mehrzahl aneinander gebundener Schichten, wobei jede Schicht aus mindestens einer Art eines hydrophilen Polymers besteht und wobei mindestens eine Schicht der Mehrzahl von Schichten an die erste Schicht gebunden ist, und

mindestens eine Art von bioaktiver Spezies, die an mindestens eine Schicht der Mehrzahl von Schichten gebunden ist.

10

49. Material nach Anspruch 48, bei dem der Trägerbestandteil ein nicht-poröses Polymermaterial aufweist.

15

50. Material nach Anspruch 49, bei dem das nicht-poröse Polymermaterial ausgewählt ist aus einem Glied der Gruppe, die besteht aus Polytetrafluorethylen, Polyethylen, Polypropylen, Polyethylenterephthalat, Polystyrol, Polysulfon, Polycarbonat und regenerierter Cellulose.

20

51. Material nach Anspruch 48, bei dem der Trägerbestandteil ein poröses Polymermaterial aufweist.

25

52. Material nach Anspruch 51, bei dem das poröse Polymermaterial ausgewählt ist aus einem Glied der Gruppe, die besteht aus porösem Polytetrafluorethylen, porösem Polyethylen, porösem Polypropylen, porösem Polyethylenterephthalat, porösem Polyurethan, porösem Silikonkautschuk, porösem Polystyrol, porösem Polysulfon, porösem Polyester, porösen Polyhydroxysäuren, porösem Polycarbonat, porösem Polyimid, porösem Polyamid, porösen Polyaminosäuren und poröser regenerierter Cellulose.

53. Material nach Anspruch 48, bei dem eine Abstandhalter-Verbindung zwischen mindestens einer Schicht der Mehrzahl von Schichten und der bioaktiven Spezies eingeschoben ist.
- 5 54. Material nach Anspruch 53, bei dem die Abstandhalter-Verbindung ausgewählt ist aus einem Glied einer Gruppe, die besteht aus Succinsäure, Diaminohexan, Glyoxylsäure, kurzkettigem Polyethylenglycol und Glycin.
- 10 55. Material nach Anspruch 53, bei dem die Abstandhalter-Verbindung spaltbar ist.
56. Material nach Anspruch 55, bei dem die spaltbare Abstandhalter-Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Polyhydroxysäuren, Polyanhydriden, Polyaminosäuren, Tartraten und Cystein-Lin-
- 15 kern.
57. Verfahren zur Herstellung eines Materials mit immobilisierten bioaktiven Spezies, welches aufweist:
- 20 Bereitstellen eines Trägerbestandteils,  
Adsorbieren einer ersten Schicht, bestehend aus polymeren oberflächenaktiven Mitteln, an den Trägerbestandteil,  
Vernetzen der polymeren oberflächenaktiven Mittel in situ mit einem Vernetzungsmittel,
- 25 Binden einer zweiten Schicht, bestehend aus mindestens einer Art eines hydrophilen Polymers, an die erste Schicht, und  
Immobilisieren einer bioaktiven Spezies an der zweiten Schicht.

58. Verfahren nach Anspruch 57, bei dem der Trägerbestandteil ein nicht-poröses Polymermaterial ist.

59. Verfahren nach Anspruch 57, bei dem der Trägerbestandteil ein poröses Polymermaterial ist.

60. Verfahren nach Anspruch 57, bei dem die polymeren oberflächenaktiven Mittel ausgewählt sind aus einem Glied der Gruppe, die besteht aus Polyvinylalkohol, Polyethylenglycol, Polypropylenglycol, Dextran, Agarose, Alginat, Polyacrylamid, Polyglycidol, Polyvinylalkohol-copolyethylen, Poly(ethylenglycol-co-propylenglycol), Poly(vinylacetat-co-vinylalkohol), HPL-1, Poly(tetrafluorethylen-co-vinylalkohol), Poly(acrylnitril-co-acrylamid), Poly(acrylnitril-co-acrylsäure-acrylamidin), Polyacrylsäure, Polyamid, Polylysin, Polyethylenimin, Polyvinylpyrrolidon, Polyhydroxyethylmethacrylat, Polysulfon und Polysacchariden und ihren Copolymeren, entweder alleine oder in Kombination.

61. Verfahren nach Anspruch 57, bei dem die hydrophilen Polymere ausgewählt sind aus einem Glied der Gruppe, die besteht aus Polyvinylalkohol, Polylysin, Poly(acrylnitril-co-acrylsäure-acrylamidin), Polyacrylsäure, Polyhydroxyethylmethacrylat, Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenglycol, Alginat, Sepharose, Agarose, Polyethylenimin, Polyallylamin, Polyaminoethylmethacrylat, Polyornithin, Polyaminoacrylamid, Polyacrylamid, Polyacrolein, Polyacryloxysuccinimid, Polysulfon, Poly(acrylnitril-co-acrylamid) und ihren Copolymeren, entweder alleine oder in Kombination.

62. Verfahren nach Anspruch 57, bei dem das Vernetzungsmittel ausgewählt ist aus einem Glied der Gruppe, die besteht aus Vinylen, Imidazo-

len, Carbamaten, Aldehyden, Epoxiden, Acylhalogeniden, Alkylhalogeniden, Isocyanaten, Aminen, Anhydriden, Säuren, Alkoholen, Thiolen, Estern, Imiden und Maleimiden.

5 63. Verfahren nach Anspruch 57, außerdem aufweisend:

Verwenden einer ausreichenden Menge an Vernetzungsmittel beim Vernetzen der polymeren oberflächenaktiven Mittel in situ, so daß unumgesetzte chemisch reaktionsfähige Gruppen des Vernetzungsmittels vorhanden sind.

10

64. Verfahren nach Anspruch 57, außerdem aufweisend:

Vernetzen der polymeren oberflächenaktiven Mittel in situ mit einem Vernetzungsmittel unter Bedingungen, die keine Polymerisierung des Vernetzungsmittels bewirken.

15

65. Verfahren nach Anspruch 57, außerdem aufweisend:

Verwenden eines Katalysators mit dem Vernetzungsmittel, der nach dem Vernetzungs-Schritt als ein Gas frei wird.

20

66. Verfahren nach Anspruch 57, außerdem aufweisend:

Verwenden eines Katalysators mit dem Vernetzungsmittel in der Form eines gelösten Gases.

25

67. Material nach Anspruch 1, bei dem das Material nach dem folgenden Verfahren hergestellt ist:

Bereitstellen eines Trägerbestandteils,

Binden einer ersten Schicht, bestehend aus polymeren oberflächenaktiven Mitteln, an den Trägerbestandteil,

Vernetzen der polymeren oberflächenaktiven Mittel in situ mit einem Vernetzungsmittel,

Binden einer zweiten Schicht, bestehend aus mindestens einer Art eines hydrophilen Polymers, an die erste Schicht, und

5 Immobilisieren einer bioaktiven Spezies an der zweiten Schicht.

68. Material nach Anspruch 67, bei dem der Trägerbestandteil ein nicht-poröses Polymermaterial aufweist.

10 69. Material nach Anspruch 68, bei dem das nicht poröse Polymermaterial ausgewählt ist aus einem Glied der Gruppe, die besteht aus Polytetrafluorethylen, Polyethylen, Polypropylen, Polyethylenterephthalat, Polystyrol, Polysulfon, Polycarbonat und regenerierter Cellulose.

15 70. Material nach Anspruch 67, bei dem der Trägerbestandteil ein poröses Polymermaterial aufweist.

20 71. Material nach Anspruch 70, bei dem das poröse Polymermaterial ausgewählt ist aus einem Glied der Gruppe, die besteht aus porösem Polytetrafluorethylen, porösem Polyethylen, porösem Polypropylen, porösem Polyethylenterephthalat, porösem Polyurethan, porösem Silikonkautschuk, porösem Polystyrol, porösem Polysulfon, porösem Polyester, porösen Polyhydroxysäuren, porösem Polycarbonat, porösem Polyimid, porösem Polyamid, porösen Polyaminosäuren und poröser regenerierter  
25 Cellulose.

72. Material nach Anspruch 67, bei dem das polymere oberflächenaktive Mittel ein multifunktionelles Copolymer aufweist, das besteht aus mindestens einem Bereich mit physikalisch-chemischer Affinität zu dem Trä-



gerbestandteil und mindestens einem Bereich, der mit dem Vernetzungsmittel chemisch reaktionsfähig ist.

5 73. Material nach Anspruch 67, bei dem eine Abstandhalter-Verbindung zwischen der ersten Schicht und der bioaktiven Spezies eingeschoben ist.

10 74. Material nach Anspruch 73, bei dem die Abstandhalter-Verbindung ausgewählt ist aus einem Glied einer Gruppe, die besteht aus Succinsäure, Diaminohexan, Glyoxylsäure, kurzkettigem Polyethylenglycol und Glycin.

75. Material nach Anspruch 73, bei dem die Abstandhalter-Verbindung spaltbar ist.

15 76. Material nach Anspruch 75, bei dem die spaltbare Abstandhalter-Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Polyhydroxysäuren, Polyanhydriden, Polyaminosäuren, Tartraten und Cystein-Linkern.

20 77. Gefäßtransplantat aufweisend:  
ein poröses Polytetrafluorethylen-Material,  
eine erste Schicht, bestehend aus mindestens einer Art eines polymeren oberflächenaktiven Mittels, das an den Trägerbestandteil gebunden ist und mit sich in situ vernetzt ist,

25 eine zweite Schicht, bestehend aus mindestens einer Art eines hydrophilen Polymers, das an die erste Schicht gebunden ist, und  
mindestens ein an die zweite Schicht gebundenes Lysin-Isomer, wobei die zweite Schicht und immobilisiertes Lysin als eine Blut-Kontaktfläche dienen.

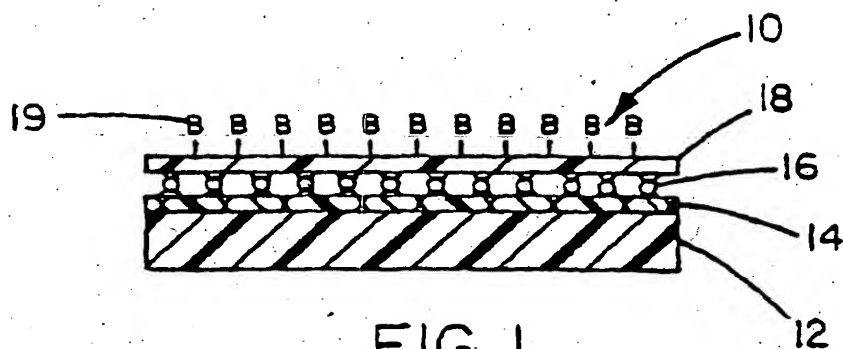


FIG. 1

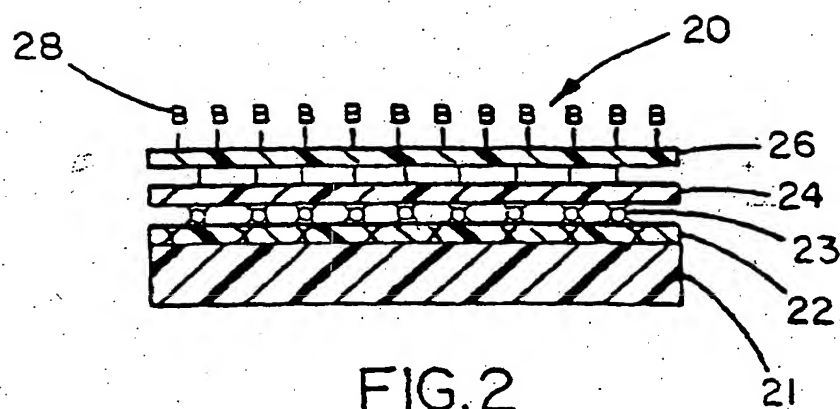


FIG. 2

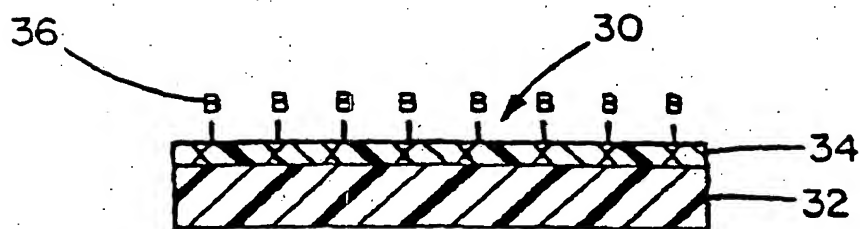


FIG. 3

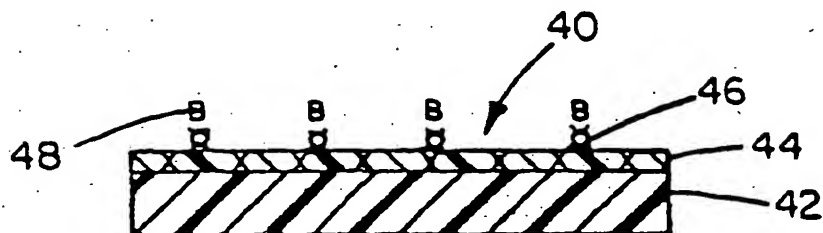


FIG. 4

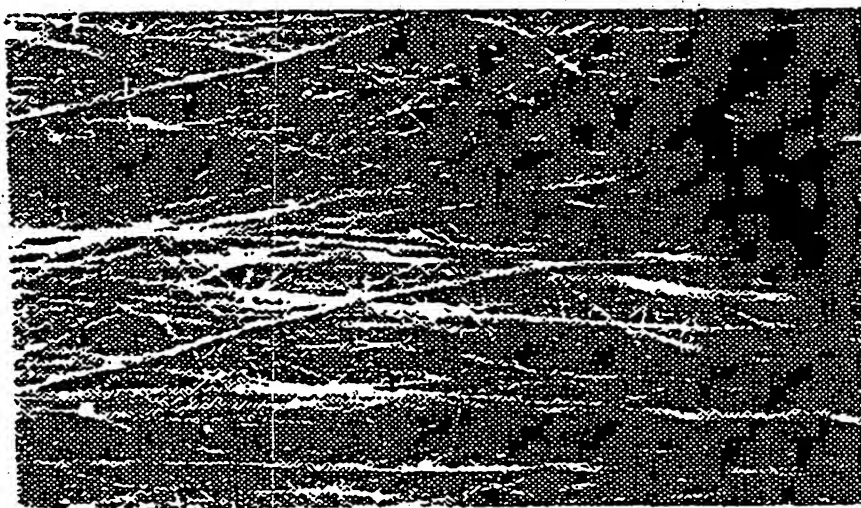


FIG. 5

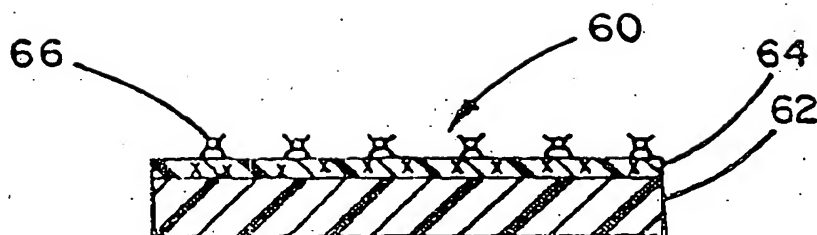


FIG. 6

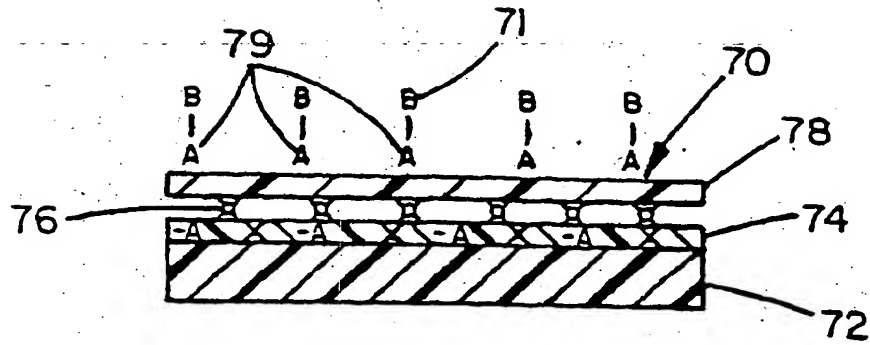


FIG. 7

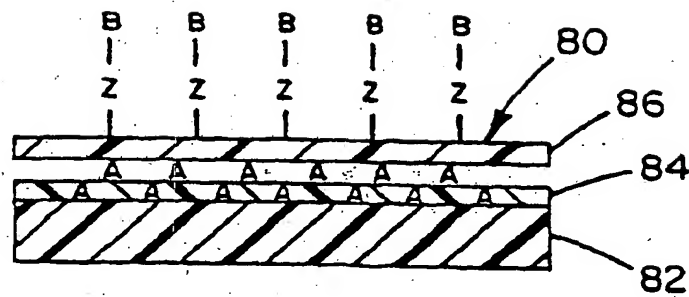


FIG. 8

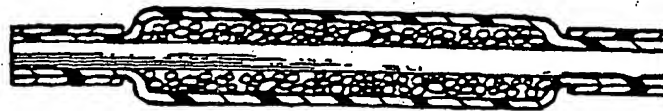


FIG. 9

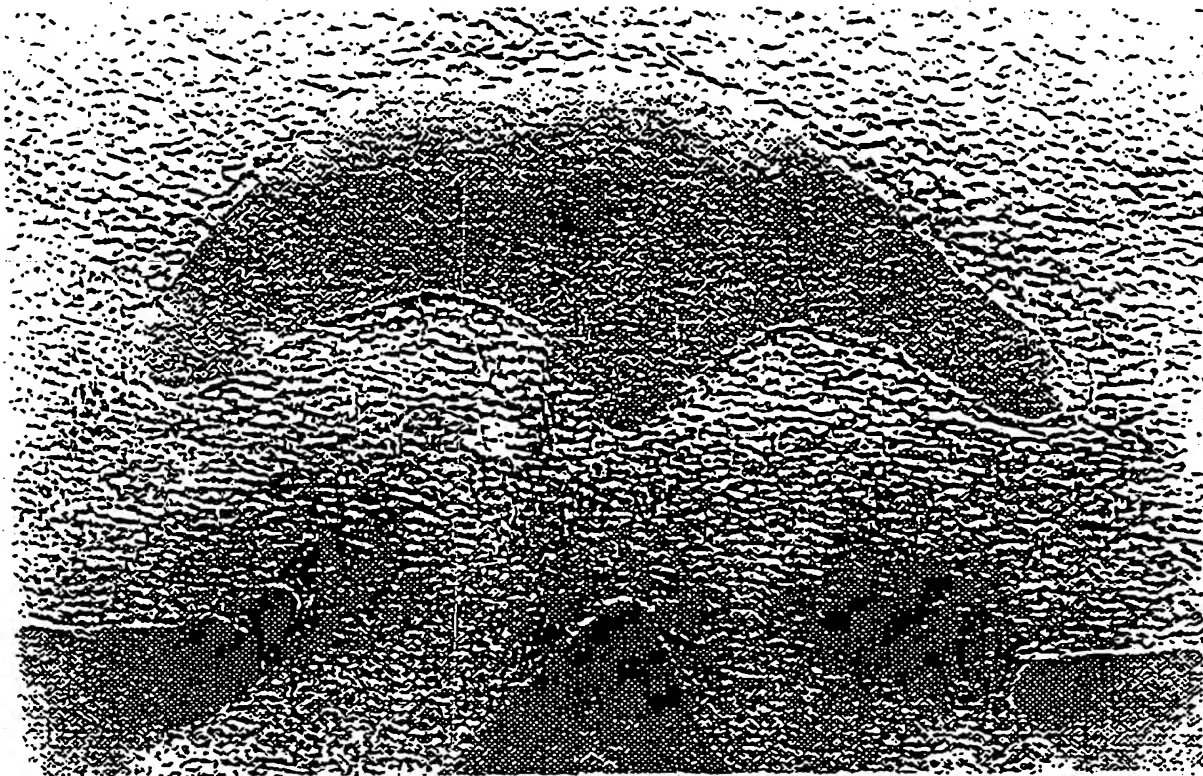


FIG. 10

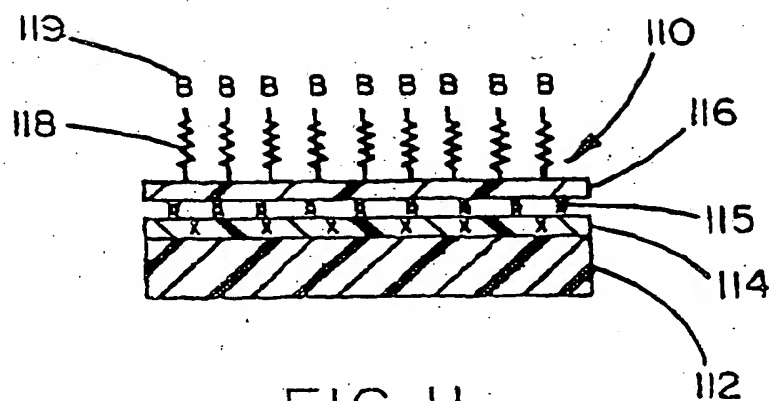


FIG. 11

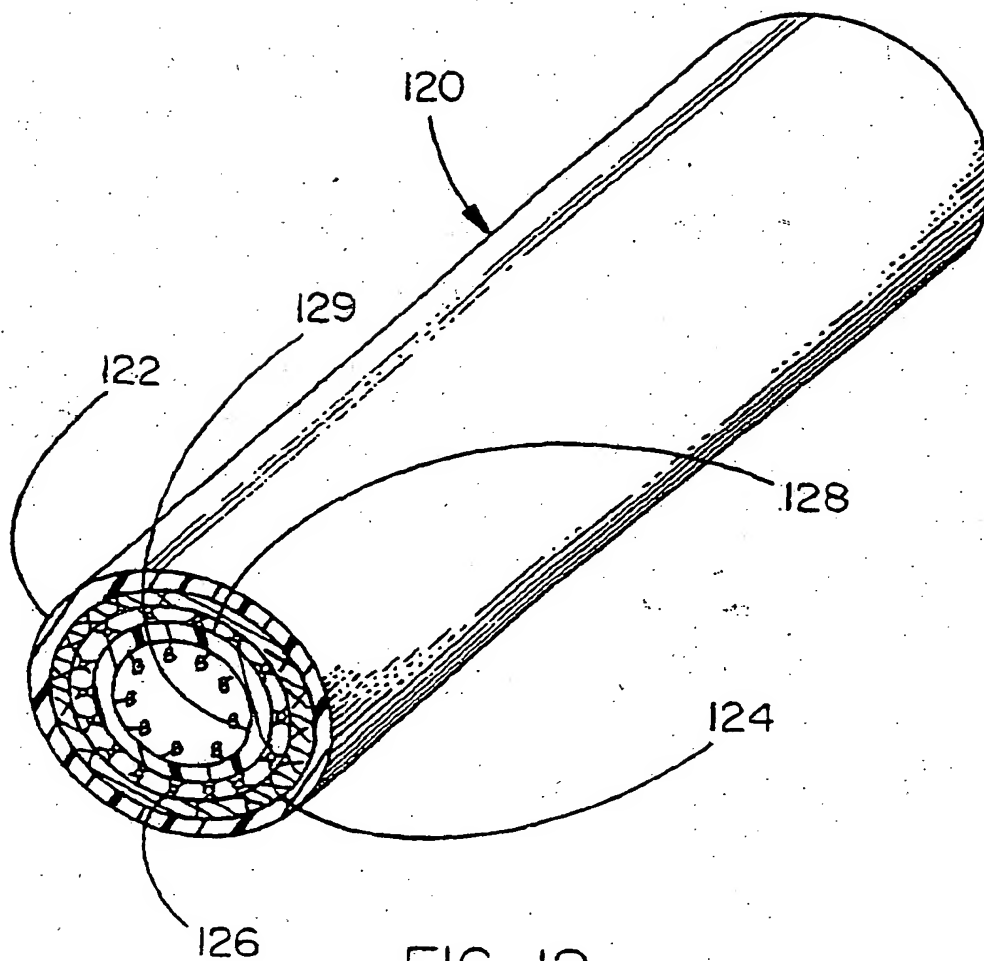


FIG. 12